

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

AJ

(11)Publication number : 2003-199587

(43)Date of publication of application : 15.07.2003

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
A01K 67/027
A61K 45/00
A61P 37/02
A61P 37/08
C07K 16/28
C12N 5/10
C12Q 1/02
G01N 33/15
G01N 33/50
G01N 33/53

(21)Application number : 2002-283379

(71)Applicant : MITSUBISHI CHEMICALS CORP

(22)Date of filing : 27.09.2002

(72)Inventor : SHIMAMURA MICHIO

(30)Priority

Priority number : 2001297452 Priority date : 27.09.2001 Priority country : JP

(54) NEW NKT CELL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain NKT cells having a different subset from V α 14 as a uniform TCR α chain, establish a fused cell line derived from the cells, and provide a method for controlling immunity by the cells and a non-human mammalian animal introduced with DNA encoding TCR α chain having the subset so as to express T-cell specifically.

SOLUTION: This new NKT cells is obtained by separating the NKT cells from a CD1d deficit animal for obtaining the NKT cells having V α 19 as the uniform TCR α chain, establishing the fused cell line of the cells with a T-cell tumor cells for analyzing the base sequence, etc. Also, by using the base sequence, the DNA encoding the TCR α chain having the subset is obtained and introduced into the non-human mammalian animal.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's

[decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2003-199587
(P2003-199587A)

(43)公開日 平成15年7月15日(2003.7.15)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	Z NA	A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 37/02	4 B 0 6 3
A 6 1 P 37/02		37/08	4 B 0 6 5
37/08		C 0 7 K 16/28	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 請求項の数16 O L (全 27 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002-283379(P2002-283379)

(22)出願日 平成14年9月27日(2002.9.27)

(31)優先権主張番号 特願2001-297452(P2001-297452)

(32)優先日 平成13年9月27日(2001.9.27)

(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 島村 道夫

東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化

学生命科学研究所内

(74)代理人 100103997

弁理士 長谷川 曜司

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規NKT細胞

(57)【要約】

【課題】 均一なT C R α 鎖として、V α 1 4と異なるサブセットを有するNKT細胞の取得、及び該細胞由來の融合細胞株の樹立、並びに該細胞による免疫制御方法の提供、および該サブセットを有するT C R α 鎖をコードするDNAをT細胞特異的に発現するように導入された非ヒト哺乳動物を提供する目的とする。

【解決手段】 CD1d欠損動物よりNKT細胞を分離することにより均一なT C R α 鎖としてV α 1 9を有するNKT細胞を取得し、該細胞とT細胞腫瘍細胞との融合細胞株を樹立して、塩基配列等を解析する。また、該塩基配列を用いて該サブセットを有するT C R α 鎖をコードするDNAを取得し、これを非ヒト哺乳動物へ導入する。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)または(b)の性質を有するNKT細胞。

(a) 配列番号1に示すアミノ酸配列を含むT細胞レセプターを有し、かつT細胞レセプターを介した刺激に応答してTh2タイプのサイトカインを産生する。

(b) 配列番号1に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるT細胞レセプターを有し、かつT細胞レセプターを介した刺激に応答してTh2タイプのサイトカインを産生する。

【請求項2】 請求項1に記載のNKT細胞を特異的に認識する抗体。

【請求項3】 抗原が、少なくとも配列番号1のアミノ酸番号110～116で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである請求項2に記載の抗体。

【請求項4】 請求項2または3に記載の抗体を有効成分として含有する免疫調節剤。

【請求項5】 血液または骨髓液の細胞群に請求項2または3に記載の抗体を接触させ、該抗体への結合度を指標として細胞を選抜することを特徴とするNKT細胞の取得方法。

【請求項6】 血液中の細胞群に、請求項2または3に記載の抗体を接触させ、該抗体への結合する細胞数を測定することを特徴とする血液中のNKT細胞の測定方法。

【請求項7】 少なくとも請求項2または3に記載の抗体を含む、請求項6に記載の方法に用いるための試薬キット。

【請求項8】 被検物質と請求項1に記載のNKT細胞とを共培養し、該NKT細胞の表現型の変化を指標として被検物質を選抜することを特徴とする免疫調節活性を有する物質のスクリーニング方法。

【請求項9】 被検物質が抗原提示細胞に提示されていることを特徴とする請求項8に記載の方法。

【請求項10】 被検物質と請求項1に記載のNKT細胞とを、請求項2または3に記載の抗体の存在下で共培養し、被検物質による該NKT細胞と該抗体との結合性の阻害度を指標として被検物質を選抜することを特徴とする免疫調節活性を有する物質のスクリーニング方法。

【請求項11】 請求項8～10のいずれかに記載のスクリーニング方法により得られる物質を有効成分とする免疫調節剤。

【請求項12】 請求項8～10のいずれかに記載のスクリーニング方法により選抜された物質を製剤化することを特徴とする免疫調節剤の製剤化方法。

【請求項13】 以下の(a)または(b)のT細胞レセプター α 鎖をコードするDNAがT細胞特異的に発現するように導入されていることを特徴とする非ヒト哺乳動物。

2

(a) 配列番号1に示すアミノ酸配列を含むT細胞レセプター α 鎖。

(b) 配列番号1に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるT細胞レセプター α 鎖であって、NKT細胞に発現させたとき、該NKT細胞がT細胞レセプターを介した刺激に応答してTh2タイプのサイトカインを産生するもの。

【請求項14】 DNAが配列番号8に示す塩基配列を有することを特徴とする請求項13に記載の動物。

【請求項15】 請求項13または14に記載の動物に被検物質を投与し、該動物体内的イムノグロブリンEの発現量の変化を解析し、該発現量を調節する作用を指標として被検物質を選抜することを特徴とする抗アレルギー作用を有する物質のスクリーニング方法。

【請求項16】 保有するNKT細胞の全てが請求項1に記載のNKT細胞である非ヒト哺乳動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は新規なNKT細胞および該NKT細胞が有するT細胞レセプター α 鎖をコードするDNAがT細胞特異的に発現するように導入されていることを特徴とする非ヒト哺乳動物に関する。具体的には、該細胞が有するT細胞レセプターが特有のアミノ酸配列を有しており、かつT細胞の刺激によりTh2タイプのサイトカインを産生するNKT細胞、該NKT細胞を抗原とする抗体、該抗体を有効成分として含有する免疫調節剤、該NKT細胞を利用した免疫調節活性を有する物質のスクリーニング方法、該NKT細胞が有するT細胞レセプター α 鎖をコードするDNAがT細胞特異的に発現するように導入されている非ヒト哺乳動物、及びその利用等に関する。

【0002】

【従来の技術】NKT細胞はナチュラルキラーマーカーであるNK1.1、及びT細胞抗原レセプターを併せて発現するユニークなリンパ球である。従来、NKT細胞ではそのT細胞レセプター(以下、「TCR」と称することがある) α 鎖としてマウスではV α 14-J α 28.1、ヒトではV α 24-J α Qでいずれも均一なサブセットを有するもの(以下、「V α 14NKT細胞」と称することがある)が知られており、さらにその β 鎖も、V β 8.7、及び2の特定の β 鎖と対を組むことでT細胞レセプターとして非常に均一な構造を有することが知られている(非特許文献1を参照。)。さらに、NKT細胞はこの均一なT細胞レセプターにより、非古典的MHCクラスI分子に属するCD1dに提示される特殊な糖脂質(α -ガラクトシルセラミド(GalCer))を抗原として認識し、活性化される(非特許文献2を参照。)ことも知られている。

【0003】このNKT細胞は、上記のT細胞レセプタ

50

ーを介した刺激に応答して、インターロイキン-4（以下、「IL-4」と称することがある）、やインターフェロン- γ （以下、「IFN- γ 」と称することがある）等のサイトカインを分泌し、Th1/Th2細胞分化の方向付け等免疫系制御に重要な役割を果たしていることが示唆されている（非特許文献3および4を参照。）。このことは、実際に免疫系制御の破綻した自己免疫疾患の体内においては、V α 14NKT細胞が減少していることによっても示唆される（非特許文献5および6を参照。）。

【0004】また、V α 14NKT細胞については、生体内で上記した糖脂質によってTCRを介して特異的に活性化された場合、抗腫瘍活性があることが知られており（非特許文献7を参照。）、その抗腫瘍性はヒトの同型NKT細胞においても同様である。このような機能においてNKT細胞は注目され研究が進められていた。

【0005】一方、V α 14NKT細胞の発生が抑制されるCD1d遺伝子欠損（CD1d-/-）マウスにおいてはI型アレルギー誘導物質投与に伴うIgEの産生が野生型マウスと有意な差が見られないとの報告があり（非特許文献8～10を参照。）、特にTh2細胞への分化誘導に対してのV α 14NKT細胞の役割には疑問が投げかけられていた。また、このCD1d遺伝子欠損マウスにおいて、NK1.1、T細胞レセプター共陽性のNKT細胞の表現型を有する細胞が依然として存在し、V α 14NKT細胞とは異なるNKT細胞サブセットの存在が示唆された（非特許文献11を参照。）。

【0006】これらの事実に基づき、NKT細胞集団の異種混合性に注目し、V α 14NKT細胞とは異なるNKT細胞サブセット、あるいはそれに由来する細胞を取得し、解析することにより、該細胞によるV α 14NKT細胞とは異なる免疫系制御方法の開発が期待された。一方、哺乳動物末梢血についてのrtPCR分析から、均一なTCR α 鎖としてV α 19.1を発現する細胞の存在が示された。さらに、このTCRを発現するマウス細胞に由来する融合細胞株が作成され、該融合細胞が有するTCR α 鎖、及び β 鎖の塩基配列が決定された（非特許文献12を参照。）。しかし、ここで均一なTCR α 鎖、及び β 鎖を有する細胞がNKT細胞に属する細胞由来であるかについては調べられておらず、また該細胞の他の性質、及び機能等については解析が行われていない。従ってこれがV α 14以外の均一なTCRを発現するNKT細胞サブセットであるかについては依然として不明であった。

【0007】

【非特許文献1】Makino, Y., et al., Int. Immunol., 7, 1157-1161 (1995); Ohteki, T., et al., J. Exp. Med., 183, 1277-1282 (1996)

【非特許文献2】Kawano, T., et al., Science, 278, 1626-1629 (1997)

【非特許文献3】Arase, H., et al., J. Exp. Med., 183, 2391-2396 (1996)

【非特許文献4】Yoshimoto, T., et al., Science, 270, 1845-1847 (1995)

10 【非特許文献5】Mieza, M. A., et al., J. Immunol., 156, 4035-4040 (1996)

【非特許文献6】Wilson, S. B., et al., Nature, 391, 177-181 (1998)

【非特許文献7】Kawano, T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 5690-5693 (1998)

20 【非特許文献8】Smiley, S. T., et al., Science., 275, 977-979 (1997)

【非特許文献9】Chen, Y.-H., et al., Immunity, 6, 459-467 (1997)

【非特許文献10】Mendiratta, S. K., et al., Immunity, 6, 469-477 (1997)

30 【非特許文献11】Eberl, G., et al., J. Immunol., 162, 6410-6419 (1999)

【非特許文献12】Tillioy, F., et al., J. Exp. Med., 189, 1907-1921 (1999)

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、NKT細胞集団の異種混合性に注目し、V α 14とは異なる均一なTCRを発現するNKT細胞（以下、これを「非V α 14NKT細胞」と称することがある）を取得、解析することの必要性を考え、非V α 14NKT細胞の取得、該細胞由来の融合細胞株の樹立、及び該細胞による免疫系制御方法を開発すること、並びに該NKT細胞が有するT細胞レセプター α 鎖をコードするDNAがT細胞特異的に発現するように導入された非ヒト哺乳動物を取得すること等を目的としてなされたものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を達成すべく鋭意検討した結果、CD1d欠損マウス中のNKT細胞様細胞集団中から、V α 14とは異なる均一なV α 鎖を発現する細胞を取得した。また、該細胞に由来する融合細胞株を樹立し、当該細胞が有するV α

鎖、及び β 鎖の構造を解析したところ、均一な $V\alpha 1.1 - J\alpha 2.6$ を発現していることを見出した。さらに、取得した融合細胞についてそのTCRを介した刺激に応答したサイトカインの分泌を解析したところ $IL-4 / IFN-\gamma$ の分泌量の比率が、同様の方法で作成した $V\alpha 1.4 NKT$ 細胞由来の融合細胞株と比較して大きいことを見出した。また、上記の $V\alpha 1.9.1 - J\alpha 2.6$ を有するT細胞レセプター α 鎖をコードするDNAを取得し、これをC57BL/6マウスの受精卵に注入してトランシジェニックマウスを得たところ、Th2タイプのサイトカインを産生するNKT細胞が多く発現している動物が取得された。また、該動物のイムノグロブリンEの産生量は、野生型に比べて多く、逆にヤギ抗マウスイムノグロブリンD抗体の刺激によるイムノグロブリンE産生の上昇が野生型に比べて抑制されていることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて成し遂げられたものである。

【0010】即ち、本発明によれば、(1)以下の(a)または(b)の性質を有するNKT細胞、(a)配列番号1に示すアミノ酸配列を含むT細胞レセプターを有し、かつT細胞レセプターを介した刺激に応答してTh2タイプのサイトカインを産生する、(b)配列番号1に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が消失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるT細胞レセプターを有し、かつT細胞レセプターを介した刺激に応答してTh2タイプのサイトカインを産生する、(2)上記(1)に記載のNKT細胞を特異的に認識する抗体、(3)抗原が、少なくとも配列番号1のアミノ酸番号110~116で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである上記(2)に記載の抗体、

(4)上記(2)または(3)に記載の抗体を有効成分として含有する免疫調節剤、(5)血液または骨髓液の細胞群に上記(2)または(3)に記載の抗体を接触させ、該抗体への結合度を指標として細胞を選抜することを特徴とするNKT細胞の取得方法、(6)血液中の細胞群に、上記(2)または(3)に記載の抗体を接触させ、該抗体への結合する細胞数を測定することを特徴とする血液中のNKT細胞の測定方法、(7)少なくとも上記(2)または(3)に記載の抗体を含む、上記

(6)に記載の方法に用いるための試薬キット、(8)被検物質と上記(1)に記載のNKT細胞とを共培養し、該NKT細胞の表現型の変化を指標として被検物質を選抜することを特徴とする免疫調節活性を有する物質のスクリーニング方法、(9)被検物質が抗原提示細胞に提示されていることを特徴とする上記(8)に記載の方法、(10)被検物質と上記(1)に記載のNKT細胞とを、上記(2)または(3)に記載の抗体の存在下で共培養し、被検物質による該NKT細胞と該抗体との結合性の阻害度を指標として被検物質を選抜することを特徴とする免疫調節活性を有する物質のスクリーニング

方法、(11)上記(8)~(10)のいずれかに記載のスクリーニング方法により得られる物質を有効成分とする免疫調節剤、(12)上記(8)~(10)のいずれかに記載のスクリーニング方法により選抜された物質を製剤化することを特徴とする免疫調節剤の製剤化方法、(13)以下の(a)または(b)のT細胞レセプター α 鎖をコードするDNAがT細胞特異的に発現するように導入されていることを特徴とする非ヒト哺乳動物、(a)配列番号1に示すアミノ酸配列を含むT細胞レセプター α 鎖、(b)配列番号1に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が消失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるT細胞レセプター α 鎖であって、NKT細胞に発現させたとき、該NKT細胞がT細胞レセプターを介した刺激に応答してTh2タイプのサイトカインを産生するもの、(14)DNAが配列番号8に示す塩基配列を有することを特徴とする上記(13)に記載の動物、(15)上記(13)または(14)に記載の動物に被検物質を投与し、該動物体内のイムノグロブリンEの発現量の変化を解析し、該発現量を調節する作用を指標として被検物質を選抜することを特徴とする抗アレルギー作用を有する物質のスクリーニング方法、(16)保有するNKT細胞の全てが上記(1)に記載のNKT細胞である非ヒト哺乳動物、が、提供される。

【0011】

【発明の実施の形態】以下、発明の内容を詳細に説明する。

(1) 非 $V\alpha 1.4 NKT$ 細胞の取得

本発明のNKT細胞の供給源としては、従来知られている $V\alpha 1.4 NKT$ 細胞と異なるサブセットを有するNKT細胞を有しているものであれば如何なるものであってもよいが、NKT細胞のマーカーとして現在入手可能であるものがNK1.1のみであることから、該マーカーを発現しているNKT細胞を有するものが特に好ましく用いられる。具体的には、 $V\alpha 1.4 NKT$ 細胞が認識するCD1dが欠損しており $V\alpha 1.4 NKT$ 細胞の発生が抑制されているCD1d欠損動物で、かつNKT細胞マーカーであるNK1.1を発現する動物等が挙げられる。このCD1d欠損動物は、上記性質を有する動物であれば特に制限されないが、具体的には、例えば、ハーバード大学医学部のM. J. Grusby博士によって樹立されたCD1d-/マウス(Smiley, S. T., et al., Science., 275, 977-979 (1997))等(以下、これを「CD1d-/マウス」と称することがある)が好ましく用いられる。ここで、CD1d-/マウスは、ターゲッティングベクターを導入した129系統マウスES細胞をBALB/cマウスに移植して作成したものであり、NK1.1を発現していないため、これを発現するC57BL/6マウスと交配を繰り返すことにより得られるNKT

1. 1陽性、H-2ハプロタイプがbのCD1d-/マウスが特に好ましく用いられる。

【0012】このような動物から肝臓等の適当な臓器、あるいは血液等を採取し、それ自体既知の通常用いられる方法によりこれらに含有される細胞を分離した後、適当な標識物質を結合させたNKT細胞のマーカー分子と接触させ、該マーカー分子に結合させた標識から発せられるシグナルを指標としてNKT細胞を選抜し取得することができる。採取する臓器としては、NKT細胞がより多く存在する肝臓が特に好ましい。NKT細胞のマーカー分子としては、NKT細胞特異的に発現しているタンパク質に結合する物質であれば如何なるものであってもよいが、具体的には、例えば、ナチュラルキラー細胞レセプターの一つであるNK1の特異的抗体等と、T細胞レセプターの特異的抗体の組み合わせ等が好ましく用いられる。ここで、上記NK1のうち、そのアロタイプの一つであるNK1.1の特異的抗体が現在唯一入手可能なナチュラルキラー細胞のマーカー分子である。

【0013】マーカー分子に結合させる標識物質としては、これが発するシグナルを検出する検出機器に適したものを選択して用いることができるが、例えば、標識物質としてFITC等の蛍光物質を用いる場合にはフローサイトメーター等により蛍光を感知して分離する方法が用いられ、また標識物質がビオチンのような特定の物質に結合する性質を有するものであれば、これと結合するストレプトアビジン等を結合したマグネットイックビーズ等を用いて分離する方法を用いることができる。かくして得られた、V α 14とは異なる均一なV α 鎖を有するNKT細胞を、非V α 14NKT細胞とした。

【0014】(2) 非V α 14NKT細胞のT細胞レセプターの構造解析

上記で得られた非V α 14NKT細胞については、これが有するT細胞レセプターのサブセットの構造を解析することにより、均一なV α 鎖、及び β 鎖を有するNKT細胞であること、及びそのアミノ酸配列を確認することができる。しかし、上記した取得方法によった場合、最もNKT細胞の含有率の高い肝臓を供給源とした場合にも非V α 14NKT細胞は有核細胞全体の1~2%程度しか回収できず、取得できる細胞は極少ない。従って、これらの細胞が有するT細胞レセプターの構造解析を行う場合、これらの細胞とT細胞腫瘍細胞との融合細胞を作成し、該融合細胞を増殖させ、これを用いてT細胞レセプターのサブセットの構造を解析するのが好ましい。

【0015】用いられるT細胞腫瘍細胞は、特に限定されないが、上記非V α 14NKT細胞を取得した動物と同種の動物の細胞株を用いるのが好ましい。非V α 14NKT細胞がマウスから取得された場合には、マウスのT細胞腫瘍細胞、具体的には、BW5147のTCR陰性の変異株(Born, W. et al., Res. Immunol., 7, 279-291 (1988))等

が好ましく用いられる。細胞の融合は、齋藤隆ら、新生化学実験講座12、分子免疫学I、p. 141-147

(1989)、東京化学同人等に記載の常法を用いることができる。具体的には、例えば、まず、非V α 14NKT細胞を、X照射等により細胞分裂能を消失させたバックグラウンドが同一の動物の脾臓単核細胞の存在下で前培養する。この際、TCRを発現する細胞を選択的に増殖させるために抗TCR $\alpha\beta$ 抗体や、IL-7等を添加することが好ましい。前培養後、非V α 14NKT細胞とT細胞腫瘍細胞を適当な割合で混合し、適当な細胞融合培地、例えば RPMI 1640やMEM培地等に、50%ポリエチレンリコール(PEG)を溶解した培地等で培養することにより行うことができる。また、上記細胞融合は、電気融合法(U. Zimmerman et al., Naturwissenschaften, 68, 577 (1981))によっても行うことができる。

【0016】上記培養細胞群から融合細胞を選択する方法としては、融合させるT細胞腫瘍細胞として8-アザグアニン耐性株を用いた場合には、適量のヒポキサンチン・アミノブテリン・チミジン(HAT)液を溶解したHAT培地で培養することにより融合細胞のみ生育させて行うことができる。選択培地において増殖してきた細胞に対し、限界希釈法等を用いてこれをクローン化し、さらに各細胞株についてNKT細胞であることを確認して、本発明の融合細胞を取得することができる。NKT細胞であることの確認は、上記と同様の方法で行うことができる。かくして得られる非V α 14NKT細胞由来融合細胞として、NB102、NB103、NB10

4、NB110、NB115、NB116、NB201、NB202、NB204、NB206、NB208、NB209、NB211、NB212、NB213、NB215、NB308、NB403、NB404、NB405、NB408等が挙げられる。

【0017】(3) 非V α 14NKT細胞のTCRの構造解析

非V α 14NKT細胞が有するTCRの構造解析は、上記動物肝細胞より得られた細胞でも、該細胞由来の融合細胞のTCRを解析することによっても行うことができる。NKT細胞のTCRは α 鎖と β 鎖のヘテロダイマーで構成され、 α 鎖は可変(V)領域、結合(J)領域、定常(C)領域からなり、 β 鎖はV領域、J領域、C領域、及び多様性(D)領域からなる。通常、TCRは抗原特異的な認識ができるよう遺伝子レベルで再構成が行われサブセットが多様性を有するが、従来知られているNKT細胞であるV α 14NKT細胞はこのV α 、J α 、V β 鎖を構成するサブセットが均一であり、これに特異的に結合する抗原(CD1d上に提示された糖脂質)を認識する。本発明のNKT細胞も同様に特殊な抗原を認識するための均一なV、及びJ領域を有すること

が予想されるため、このTCRの遺伝子レベルでの解析を行うものである。

【0018】上記で取得した非V α 14NKT細胞のV α 、J α 、V β 、あるいはJ β の遺伝子レベルでの構造解析の方法としては、非V α 14NKT細胞、または該細胞由来の融合細胞からそれ自体既知の通常用いられる方法によりRNAを調製し、これを鏡型としてcDNAを合成し、配列決定を行う方法が好ましい。RNAは、Total RNAでもmRNAでもよく、その抽出法も常法を用いることができ、その後のcDNA合成に適したものを選択して用いることができる。具体的には、ISOGENT(ニッポンジーン社)等の市販のキットを用いる方法や、Acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform(AGPC)法(Chomczynski, P., et al., Anal. Biochem., 162, 156-159 (1987))等が挙げられる。

【0019】RNAを鏡型としたcDNAの合成法も、それ自体既知の適当な方法を用いることができるが、本発明のNKT細胞が有するTCR α 鎖はその5'側に位置するV、J領域の配列は未知であるが、3'側に位置するC領域についてはその配列が保存されており、既知であるため、該領域の配列に相補的なプライマーを用いた5'RACE法を用いて行うことが好ましい。5'RACE法については特に制限はないが、市販のキットを用いて行うのが簡便である。具体的には、例えば、5'-Full RACE Core Set(TAKARA社製)等が好ましく用いられる。

【0020】このようにして取得した非V α 14NKT細胞のV α 鎖、及びJ α 鎖を解析したところ、均一なV α 19.1-J α 26鎖で構成されるTCRを有するNKT細胞が最も多かったため、このサブセットを有するNKT細胞を本発明のNKT細胞(以下「V α 19NKT細胞」と称することがある)とした。ここで、V α 19.1-J α 26鎖を構成するアミノ酸配列としては、例えば、配列番号1に示すアミノ酸配列を有するものが挙げられる。V α 19.1-J α 26はマウスのTCRサブセットであるが、他種の動物においてこれと相同性の高いDNA配列によりコードされるTCRを有するNKT細胞も、下述のサイトカイン産生解析によってTh2タイプのサイトカインを産生する機能を有する事が確認されれば、本発明のV α 19NKT細胞に含有されるものである。このようなNKT細胞として具体的には、均一なTCR α 鎖としてヒトV α 7S2-J α 33のサブセット(配列番号2)を有するNKT細胞が挙げられる。本明細書中では、配列番号1に記載のアミノ酸配列または、これらのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含むTCR α 鎖を、全て「V α 19-TCR α 鎖」と称することがある。

【0021】すなわち、本発明のNKT細胞は、a)配列番号1に示すアミノ酸配列を含むT細胞レセプターを有し、かつT細胞レセプターを介した刺激に応答してTh2タイプのサイトカインを産生する性質を有するもののみならず、b)配列番号1に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるT細胞レセプターを有し、かつT細胞レセプターを介した刺激に応答してTh2タイプのサイトカインを産生する性質を有するものも含有する。ここで、配列番号1において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列の具体例として、図1に示すとおり、配列番号1においてアミノ酸番号110のArgがLeu、GlyまたはIleに置換された配列、アミノ酸番号112のSerがArgに置換された配列等を挙げることができる。

【0022】(4) NKT細胞のサイトカイン産生解析
本発明のNKT細胞がその均一なV α 鎖、及び β 鎖を有するTCRへの刺激に応答して発現するサイトカインの種類、及びその量を解析する方法としては、それ自体既知の通常用いられる方法を適宜選択して用いることができる。TCRへの刺激の誘導法としては、例えば、V α 19NKT細胞、あるいは該細胞由来の融合細胞の細胞膜上に点在するTCRを、抗CD3 ϵ 抗体等により集合させる方法が挙げられる。抗CD3 ϵ 抗体等によるNKT細胞のTCRの集合は、例えばNKT細胞を該抗体をコートした培養皿において培養する方法や、NKT細胞と該抗体を共培養して接觸させた後に、抗CD3 ϵ 抗体に特異的に結合する2次抗体を添加する方法等が挙げられる。TCRへの刺激を誘導後、該NKT細胞をさらに培養し、該培養液の上清に対して、各種サイトカインの抗体を用いたEnzyme-linked immunosorbent assay(ELISA: Engvall, E., et al., Immunochemistry, 8(9), 871-874 (1972))を用いて測定すること等により、TCRへの刺激に応答して本発明のNKT細胞が産生するサイトカインの種類、及びその量を解析することができる。上記の解析により、本発明のV α 19NKT細胞はいずれもIL-4/IFN- γ 分泌のバランスがV α 14NKT細胞株と比較してIL-4側に偏っており、Th2タイプのサイトカイン産生能があることが判明した。

【0023】(5) V α 19-TCR α 鎖をコードするDNAが導入された動物の作製
上記(3)で特定されたV α 19NKT細胞が有するTCR α 鎖をコードするDNAを、ヒト以外の哺乳類動物にT細胞特異的に発現するように導入することによれば、V α 19-TCR α 鎖を発現しているNKT細胞が、野生型に比べて多い特徴を有する動物を取得することができる。

50 (i) 導入DNAの構築

本発明において、導入するDNA（以下、これを「導入DNA」と称することがある）としては、 $V\alpha 19-T$ CR α 鎖をコードしており、かつ該TCR α 鎖がT細胞特異的に発現するような構成を有するものであれば如何なるものでもよい。具体的には、TCR α 鎖のL、V、J、C領域をコードするDNA（以下、これを「コーディング領域DNA」と称することがある）と、発現制御領域からなるものが用いられる。このうち、TCR α 鎖のV、J領域としては、配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるものか、あるいは、配列番号1に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ該V、J領域を含むT細胞レセプター α 鎖をNKT細胞に発現させたとき、該NKT細胞がT細胞レセプターを介した刺激に応答してTh2タイプのサイトカインを産生するものが挙げられる。また、L領域およびC領域は、用いるV、J領域のDNAと同種の動物由来のものであれば特に制限はない。具体的には、マウスのL領域およびC領域はSha, W. C., et al., Nature, 335, 271-274 (1988)に記載のものが用いられる。

【0024】コーディング領域DNAは、L、V、J、C領域がスプライシングして隣接しているものでもよいし、ゲノムDNA等を用いる場合のようにそれぞれの領域が隣接していない場合には、各々がスプライシングしてL、V、J、C領域が隣接したDNAとなり得る構造を有していれば何れのものでもよい。

【0025】L、V、J、C領域が隣接しているDNAの取得の方法としては、 $V\alpha 19$ NKT細胞を含む細胞群からそれ自体既知の方法によりcDNAライブラリー等を調製し、上記(3)で得られた $V\alpha 19-T$ CR α 鎖のV、J領域の塩基配列を有するプローブ等を用いてスクリーニングして取得するか、あるいは、該cDNAライブラリーを鋳型として、L領域の5'末端の塩基配列を有するプライマーと、C領域の3'末端の塩基配列を有するプライマーを用いたポリメラーゼチャイニング（PCR）により取得する方法等が挙げられる。L、V、J、C領域が隣接していないDNAの構造の例を以下に説明する。VおよびJ領域は、上記のアミノ酸配列を有するものをコードするDNAであることが必須であるので、既に $V\alpha 19.1-J\alpha 26$ がリアルンジしたDNAを用いることが好ましい。このようなDNAとしては、本発明のNKT細胞のcDNAとして上記と同様に取得するか、または、本発明のNKT細胞等からゲノムDNAを抽出した後に上記と同様のスクリーニングまたはPCR等によりゲノムDNAとして取得することもできる。

【0026】上記のようにTCR α 鎖のV、J領域として、単独でコーディング領域DNAを取得した場合は、LおよびC領域とスプライシングするためのシグナル配

列を付加する。スプライシングシグナルを有するDNAとしては、該V、J領域が、L及びC領域とスプライシングし得るものであれば何れのものでもよい。具体的には、上記TCR α 鎖のV、J領域のゲノム上の5'上流側、あるいは3'下流側のイントロンを用いることが好ましい。イントロンDNAの長さは、スプライシングシグナルを含む限り特に制限はない。取得方法としては、 $V\alpha 19$ NKT細胞等からゲノムDNAを調製し、これを鋳型としたPCR等により取得することができる。取得したイントロンDNAがスプライシングシグナルを有し、導入DNAにおいてこれが有効であるとの確認は、導入DNAをBW5147 (ATCC:CRL-1588)等のT細胞株に通常の方法で導入し、導入細胞からcDNAを抽出してこの塩基配列を解析すること等により行うことができる。

【0027】L領域およびC領域のDNAとしては、ゲノムDNAでもcDNAでもよい。取得方法としては、TCR α 鎖を発現している細胞からcDNAを取得して上記と同様にスクリーニングまたはPCRにより取得するか、ゲノムDNAから同様にして取得することもできる。TCR α 鎖をコードするゲノムDNAとしては、例えば、マウスの場合、Sha, W. C., et al., Nature, 335, 271-274 (1988)に記載のもの等が挙げられる。かくして取得されたL、V、J、C領域DNAを隣接することによりコーディング領域DNAを調製することができる。

【0028】導入DNAに含まれる発現制御領域としては、転写調節領域、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー領域等を適宜選択して用いることができる。転写調節領域としては、転写開始点又はキャップ構造等を含むmRNAの5'一非翻訳領域や、転写終止点やpoly-Aシグナル等を含むmRNAの3'一非翻訳領域等が挙げられる。転写調節領域としては、これが制御する遺伝子をT細胞特異的に発現させる活性を有するものが用いられる。具体的には、適当なT細胞 α 鎖をコードするゲノムDNAの5'上流領域等が用いられる。これらの転写調節領域は、 $V\alpha 19$ NKT細胞のTCR α 鎖をコードするゲノムDNAの5'領域や、cDNAの3'一非翻訳領域等をそれ自体既知の方法により取得して用いることもできるし、他のTCR α 鎖の転写調節領域を用いることもできる。他のTCR α 鎖の転写調節領域としては、ゲノムDNAの $V\alpha 8.4$ のコード領域の5'上流約1.8kbのDNA断片(Asada, A., et al., Immunology, 101, 309-315(2000))が用いられる。このDNA断片には、リーダー配列も含むのでこれらと共に用いることが好ましい。

【0029】また、エンハンサー及びサイレンサーは、遺伝子の転写開始部の5'上流やゲノムのイントロン中に存在するもののうち、本発明のTCR α 鎖の発現に用いるプロモーターの活性制御に有効であるものを選択し

て用いることができる。エンハンサーとしては、TCR α 鎖に特異的なエンハンサーを用いることが好ましい。このようなエンハンサーとしては、ゲノムDNAのTCR α 鎖のC領域の下流に存在する領域が挙げられ、上記C領域とともに取得することが好ましい。

【0030】これらの適当な発現制御領域とTCR α 鎖をコードするDNAを連結して構築される導入DNAの具体例としては、例えば、図3に示される、V α 8.4プロモーターーLーイントロンーV α 19.1ーJ α 2.6 cDNAーイントロンーC α ゲノムDNAー α エンハンサーを直列に連結したもの等が挙げられる。このようなDNAの塩基配列としては、配列番号8に示すもの等が挙げられる。

【0031】(ii)ヒト以外の遺伝子改変動物の作製かくして調製される導入DNAを、ヒト以外の哺乳動物生殖細胞に導入して遺伝子改変動物細胞を作製し、さらにこれを発生させることによりヒト以外の遺伝子改変動物を作製することができる。

【0032】本発明で用いるヒト以外の動物生殖細胞は、これらに前記導入DNAを導入して発生させることにより、V α 19-TCR α 鎖をT細胞特異的に発現したヒト以外の遺伝子改変動物を作製できるものであれば、如何なるものでもよい。ここで、ヒト以外の哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ヤギ、ブタ、イヌ、ネコ等が挙げられる。これらの中で、マウス、ラット、モルモット等の齧歯類が好ましく、マウスがより好ましい。

【0033】動物生殖細胞としては、卵割前の受精卵が好ましく用いられる。このような受精卵は、ヒト以外の動物の雄と雌を交配させることによって得られる。受精卵は、自然交配によっても得られるが、動物の雌の性周期を人工的に調節した後、雄と交配させる方法が好ましい。動物の雌の性周期を人工的に調節する方法としては、例えば、初めに卵胞刺激ホルモン（妊娠馬血清性性腺刺激ホルモン；PMSG）、次いで黄体形成ホルモン（ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン；hCG）を、例えば腹腔注射等により投与する方法が挙げられる。これらホルモンの投与量、投与間隔等は、該動物の種類により適宜決定すればよい。上記の通り動物の雌にホルモン投与を行って過剝排卵させ、交配後1日目の卵管から摘出すること等によって受精卵を得ることができる。得られた受精卵は、上記(5)(i)に記載した導入DNAをマイクロインジェクション法等により注入して、動物の雌の輸卵管に人工的に移植・着床させて出産させることにより、遺伝子改変動物（トランスジェニック動物）を得ることができる。また、動物の雌に黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）あるいはその類縁体を投与した後に、動物の雄と交配させて、受精能を誘起された偽妊娠雌動物を作製し、得られた偽妊娠雌動物に受精卵を人工的に移植・着床する方法も好ましい。LHRHあるいは

その類縁体の投与量等は、ヒト以外の動物の種類によりそれぞれ異なる。さらに、上記のヒト以外の動物の雌の性周期を人工的に調節して受精卵を取得する方法と、受精能を誘起された偽妊娠雌動物にこの受精卵を人工的に移植・着床させる方法とを、組み合わせて用いるのが好ましい。

【0034】上記したV α 19-TCR α 鎖をT細胞特異的に発現するように導入されたヒト以外の哺乳動物生殖細胞を用いて本発明のヒト以外の遺伝子改変動物を作製する方法を、マウス受精卵を用いてトランスジェニックマウス（以下、これを「V α 19トランスジェニックマウス」と称することがある）を作製する場合を例に挙げてより具体的に説明する。

【0035】まず、採卵用の雌マウスに卵胞刺激ホルモン（妊娠馬血清性性腺刺激ホルモン；PMSG）及び黄体形成ホルモン（ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン；hCG）を投与して過剝排卵させ、雄マウスと交配して、墮胎確認後に卵管から受精卵を採取する。得られた受精卵の雄性前核に前記導入DNAをマイクロインジェクション法等により導入して、得られる卵細胞をWhitten'sの培地等で培養した後、偽妊娠させた雌マウスの輸卵管に移植して被移植動物を飼育し、出産させる。生まれた仔マウスからV α 19-TCR α 鎖をコードするDNA（以下、これを「V α 19遺伝子」と称することがある）を発現した仔マウスを選択することにより、V α 19トランスジェニックマウスを得ることができる。上記マウスの受精卵としては、例えば、C57BL/6、129/sv、BALB/c、C3H、SJL/Wt等に由来するマウスの交配により得られるものを用いることができるが、前核段階で細胞質内において雄性前核と雌性前核が独立したときに識別が可能であること、受精卵を多く採取できること、また、マイクロインジェクション操作に好適で産仔の発生率が高いことなどから、C57BL/6(B6)系マウス同士の交配によって得られるマウスの受精卵を用いるのが好ましい。また、導入DNAの量は100~3000コピーが適当であり、導入DNAの導入方法としては、マイクロインジェクション法やエレクトロポレーション法等の通常用いられる方法を挙げることができる。

【0036】ここで、V α 19遺伝子が導入された仔マウスの選択は、マウスの尾の先を切り取って、高分子DNA抽出法（発生工学実験マニュアル、野村達次監修・勝木元也編、講談社（1987））又はDNAeasy Tissue Kit (QIAGEN社製) 等の市販のキットを用いることによりゲノムDNAを抽出し、サザンプロット法やPCR法等の通常用いられる方法により該DNA中のV α 19遺伝子の存在を確認することによって行うことができる。また、実際にその個体内で導入されたV α 19遺伝子が発現され、V α 19-TCR α 鎖がT細胞において生成されていることは、ノザンプロット法やウエスタンプロ

ット法等の通常用いられる方法により確認することができる。あるいは、V α 14NKT細胞は、CD4陽性であるので、NK1.1及びCD8陽性細胞が、野生型に比べて多いことを後述の免疫染色法によって解析することによっても確認することができる。

【0037】本発明のヒト以外の遺伝子改変動物は、かくして得られる個体を交配し、導入されたV α 19遺伝子が安定に保持されることを確認して通常の飼育環境で継代飼育することによりその子孫を得ることもできるし、体外受精を繰り返すことによりその子孫を得て、系統を維持することもできる。本発明の動物には、かくして得られるV α 19遺伝子を有するその子孫等も含まれる。また、上記で得られたV α 19トランスジェニック動物を、TCR α 鎖ノックアウト動物(Monbaerts, P., et al., Nature, 360, 225-231(1992))と交配することによれば、該動物が有するT細胞およびNKT細胞のTCR α 鎖が、全てV α 19-TCR α 鎖である系統を取得することができる。

【0038】また、かかる動物から得られるその一部も本発明の範囲に含まれる。該動物の一部としては、例えば、頭部、指、手、足、腹部、尾等の他、臓器、組織、細胞、細胞内小器官等が挙げられる。中でも該動物から得られるV α 19-TCR α 鎖を有するNKT細胞は特に有用であって、組織培養の細胞源として機能解析やスクリーニングに用いたり、蛋白質や遺伝子を抽出して直接解析する等、種々の目的に好適に用いることができる。例えば、このような細胞中のDNAもしくはRNAを直接分析したり、あるいは遺伝子により発現された蛋白質を分析することにより、V α 19NKT細胞の機能等を解析することができる。また、該細胞をそれ自体既知の組織培養技術により培養して細胞の機能解析等に用いることもできるし、高発現細胞株があれば、そこから、抗体を作製する等への利用も可能である。かくして取得されるV α 19NKT細胞も、上記(1)～(4)に記載の細胞とともに後述の方法に用いることができ、これらをまとめて「本発明のNKT細胞」と称することがある。

【0039】(6) NKT細胞または該細胞を構成するポリペプチドを抗原とする抗体

本発明のNKT細胞を抗原とする抗体は、本発明のNKT細胞が有するポリペプチドを抗原として調製することができる。抗体の調製方法としては通常用いられる公知の方法を用いることができ、抗原として用いられるポリペプチドについても、公知の方法に従って抗原性が高くエピトープ(抗原決定基)として適した配列を選択して用いることができる。また、細胞そのものを抗原として免疫することによっても抗体を得ることができる。抗原ペプチドとして、好ましくは、配列番号1に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号109～117で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、または配列番号2に記載

のアミノ酸配列のアミノ酸番号91～99に示すものが挙げられる。上記ポリペプチドは、マウスV α 19.1-J α 26、およびヒトV α 7S2-J α 33で表されるTCR α 鎖に含まれるものであり、本発明のNKT細胞に特徴的な部分であるので、本発明のNKT細胞特異的抗体を得るための抗原としては特に好ましく用いられるものである。

【0040】抗原として用いるポリペプチドは、本発明のNKT細胞から抽出精製したものでもよいし、公知の方法に従って合成した合成ペプチドを用いることもできる。抗原となるポリペプチド、または本発明のNKT細胞は、公知の方法に従って適当な溶液等に調製して、哺乳動物、例えばウサギやラット等に免疫を行えばよいが、安定的な免疫を行ったり抗体価を高めるために抗原ペプチドの他にアジュバント等を加えて免疫を行うのが好ましい。

【0041】免疫に際しての抗原の投与経路は特に限定されず、例えば皮下、腹腔内、静脈内、あるいは筋肉内等のいずれの経路を用いてもよい。具体的には、例えばラット等に本発明のNKT細胞、あるいはそのホモジネート、またはポリペプチドを数日～数週間おきに数回接種する方法等が用いられる。また、抗原の摂取量としては、抗原がポリペプチドの場合0.1～0.5mg/1回、また細胞の場合には10⁵～10⁷個/1回が好ましいが、ポリペプチドの種類、また免疫する動物種によつては適宜調節される。

【0042】免疫後、適宜試験的に採血を行ってELISA法やウエスタンブロッティング等の方法で抗体価の上昇を確認し、十分に抗体価の上昇した動物から採血を行う。採取した血液に対し、抗体の調製に用いられる適当な処理を行うことによればポリクローナル抗体を得ることができる。また、必要に応じて公知の方法に従い血清から抗体成分を精製した精製抗体を取得することもできる。さらに、該動物の脾臓細胞等とミエローマ細胞等を公知の方法に従って融合させた融合細胞を用いる(Milstein, et al., Nature, 256, 495 (1975))ことによりモノクローナル抗体を作製することもできる。モノクローナル抗体は例えば次に述べる方法により取得することができる。

【0043】まず、上記した抗原の免疫により抗体価の高まった動物から抗体産生細胞を取得する。抗体産生細胞は、形質細胞、及びその前駆細胞であるリンパ球であり、これは個体の何れから取得してもよいが、好ましくは脾臓、リンパ節、末梢血等から取得する。これらの細胞と融合させるミエローマとしては、一般的にはマウスから得られた株化細胞、例えば8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来等)ミエローマ細胞株が挙げられる。具体的には、P3X63-Ag8.653(ATCC:CRL-1580)、P3-NS1/1Ag4.1(理研セルバンク:RCB0095)等が好ましく用

いられる。細胞の融合は、抗体産生細胞とミエローマ細胞を適當な割合で混合し、適當な細胞融合培地、例えば RPMI 1640 やイスコフ改変ダルベッコ培地 (IM DM) 、あるいはダルベッコ改変イーグル培地 (DME M) 等に、50% ポリエチレンギリコール (PEG) を溶解したもの等を用いることにより行うことができる。また電気融合法 (U. Zimmermann. et al., Naturwissenschaften, 68, 577 (1981)) によっても行うことができる。

【0044】融合細胞は、用いたミエローマ細胞株が 8-アザグアニン耐性株であることを利用して適量のヒポキサンチン・アミノブテリン・チミジン (HAT) 液、及びマウスインターロイキン-6 (IL-6) 等を含む正常培地 (HAT 培地) 中で 5% CO₂ 、37°C で適當時間培養することにより選択することができる。この選択方法は用いるミエローマ細胞株によって適宜選択して用いることができる。選択された融合細胞が產生する抗体の抗体価を上記した方法により解析し、抗体価の高い抗体を產生する融合細胞を限界希釈法等により分離する。分離した融合細胞をさらに適當な培地で培養し、得られる培養上清から硫安分画、アフィニティクロマトグラフィー等の適當な方法により精製してモノクローナル抗体を得ることができる。また精製には市販のモノクローナル抗体精製キットを用いることもできる。さらには、免疫した動物と同系統の動物、またはヌードマウス等の腹腔内で上記で得られた抗体産生融合細胞を増殖させることにより、本発明の抗 NKT 細胞モノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることもできる。

【0045】かくして得られた本発明の抗 NKT 細胞抗体は、ウエスタンブロッティングや組織免疫染色等に用いることができる。一方、本発明の NKT 細胞が有する TCR (例えば、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド) を抗原とする抗体は、該 TCR に特異的に結合することにより、これを介して誘導されるサイトカイン産生等の活性を抑制、あるいは活性化することができる。従って、本発明の抗体を抗体医薬として投与することにより本発明の NKT 細胞の TCR への刺激特異的な活性を制御することができるため、本発明の抗体は免疫調節剤として用いることができる。

【0046】(7) 抗 NKT 細胞抗体を有効成分とする免疫調節剤

本発明の抗体を抗体医薬とする場合、該抗体がマウス等の異種の動物由来するために、異種動物免疫グロブリンに対する抗体ができやすく、このため血中半減期も短い。そこで、この点を回避するためにキメラ抗体 (ヒト化抗体) 、あるいは一価抗体の作製を行う必要がある。キメラ抗体の作製方法として具体的には、(1) 本発明の抗体を產生する融合細胞より免疫グロブリンの重鎖 (H鎖) 、及び軽鎖 (L鎖) の各可変領域 (V領域) が

有するアミノ酸配列の一部を解析し、その配列を基にこれをコードする遺伝子をクローニングし、該 DNA 断片を天然のアミノ酸配列を有する公知のヒトの定常領域をコードする遺伝子 DNA と結合させて適當なベクターに挿入し、これを適當な宿主に導入して作製する方法、あるいは (2) CDR (complementarity-determining region) のみを保存し、他の全ての領域をヒト由来のものに置き換える方法 (CDR-grafted antibody: J. Nucl. Med., 31, 1077 (1990); Milstein, et al., Nature, 349, 293 (1991)) 等が挙げられる。

【0047】また、本発明の NKT 細胞としてヒトの細胞を取得した場合には、かかる細胞の TCR を構成するポリペプチド、あるいは細胞そのものを抗原として、ヒト末梢血リンパ球を移植した Severe combined immunodeficiency (SCID) マウスに上記した方法と同様にして免疫し、該免疫動物の抗体産生細胞とヒトのミエローマ細胞との融合細胞を作製することによってもヒト型抗体を作製することができる (Mosier, D. E., et al., Nature, 335, 256-259 (1988); Duchosal, M. A., et al., Nature, 355, 258-262 (1992))。また、取得したヒト型抗体を產生する融合細胞から RNA を抽出し、目的のヒト型抗体をコードする遺伝子をクローニングして、この遺伝子を適當なベクターに挿入し、これを適當な宿主に導入して発現させることにより、さらに大量に本発明のヒト型 NKT 細胞抗体を作製することができる。ここで、抗原との結合性の低い抗体は、それ自体既知の進化工学的手法を用いることによりさらに結合性の高い抗体として取得することもできる。一価性抗体は、例えばパパイン等を用いて F_ab 部分と F_c 部分を切断し、アフィニティカラム等を用いて F_ab 部分を回収することによって作製することができる。

【0048】かかる免疫調節剤は、臨床へ応用するに際し、上記有効成分を単独で用いることも可能であるが、薬学的に許容され得る担体と配合して医薬品組成物として用いることもできる。この時の有効成分の担体に対する割合は、1 ~ 90 重量% の間で変動され得る。また、かかる薬剤は種々の形態で投与することができ、それらの投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、あるいはシロップ剤等による経口投与、または注射剤、点滴剤、リポソーム剤、坐薬剤等による非経口投与を挙げることができる。また、その投与量は、症状、年齢、体重等によって適宜選択することができる。

【0049】(8) 抗 NKT 細胞抗体を利用した NKT 細胞の取得法

上記 (6) で取得した本発明の抗体は、これを適當な動物種の血液、または骨髄細胞等の細胞群と接触させるこ

とにより、本発明の前記した性質を有するNKT細胞を取得することができる。具体的には、例えば、本発明の抗体を適当な磁気ビーズ、あるいはマイクロプレート等の固相と結合させ、これに上記細胞群を接触させ、洗浄した後、該固相に本発明の抗体を介して結合している細胞を回収することにより行うことができる。あるいは、本発明の抗体に蛍光物質等の標識分子を結合させ、これに同様に細胞群を接触させた後に、ソーター等を利用して細胞が有する蛍光強度を指標として選択し、分離することにより取得することもできる。

【0050】また、同様にして血液中の本発明のNKT細胞の数を測定することもできるため、本発明の抗NKT細胞抗体は、血液中で本発明のNKT細胞数が変動する疾患の診断試薬としても用いることができる。このような診断を行うためのキットとしては、上記したように標識、または固相に結合した本発明の抗体、バッファー等の試薬類等が少なくとも含まれるが、上記した方法に用いられるキットであれば如何なる試薬等の組み合わせであってもよい。

【0051】(9) NKT細胞活性を調節する物質（免疫調節活性を有する物質）のスクリーニング

本発明の前記性質を有するNKT細胞は、該細胞と被検物質とを共培養し、該NKT細胞の生物活性に変化を誘発する物質のスクリーニングに用いることができる。本発明のNKT細胞の生物活性は、該細胞が有するTCRを介した刺激に応答した活性と、それ以外の活性に分けられる。この2つの活性を増強、または抑制する物質のスクリーニングは、例えば、次のとおり行うことができる。

(a) TCRを介した刺激非依存的な活性の調節物質のスクリーニング

本発明のNKT細胞の生物活性を調節する物質は、該細胞と被検物質を適当な培地中で培養した後、該細胞に現れる表現型の変化を指標として選択することができる。被検物質としては、本発明のNKT細胞の生物活性に影響を及ぼす可能性のある物質であれば如何なるものであってもいが、具体的には例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、低分子化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、動物組織抽出液等が挙げられる。これらの物質は新規な物質であってもよいし、公知の物質であってもよい。低分子化合物のさらに具体的な例としては、ホルモン、あるいはホルモン様物質等が挙げられ、タンパク質としては転写因子等が挙げられる。これらの該細胞培養液への添加の順序、及び添加量等は被検物質の種類によって適宜選択することができる。また、該細胞に現れる表現型としては、形状等の目に見えるものと、サイトカイン等の産生物質の量の変化等の生化学的解析法によって解析し得るものとのどちらでもよく、その表現型によってそれ自体既知の通常用いられる方法を適宜選択して解析することができる。

【0052】(b) TCRを介した刺激依存的な活性の調節物質のスクリーニング

本発明のNKT細胞と、被検物質を提示させた抗原提示細胞とを共培養し、該細胞の表現型の変化を指標として、本発明のNKT細胞のTCRを介した刺激依存的な活性の調節物質をスクリーニングすることができる。被検物質としては、上記(a)に記載したものが挙げられるが、例えばV α 14NKT細胞のTCRに特異的に結合する物質が α -Galactosidaseであり、V α 19NKT細胞の抗原認識部位の一部の構造はV α 14のそれと近似のものであること等から、本発明のスクリーニングに用いる被検物質のライブラリーとして特に好ましくは糖脂質ライブラリーが用いられる。

【0053】これら被検物質をTCRに認識させるためには、該物質を抗原提示細胞に提示させる必要がある。抗原提示細胞としては、TCRを有さず、かつMHCクラス1様分子を有するものであれば特に制限はない。このような細胞としては、例えばRAG2欠損動物等のT細胞欠損動物の脾臓細胞からC1owley, M. et al., Cell Immunol., 118, 125 (1989) に従って粗精製した樹状細胞等が好ましく用いられる。

これら抗原提示細胞への被検物質の取り込みは、それ自体既知の通常用いられる方法によることができるが、具体的には、被検物質を適当な緩衝液に溶解し、これと上記抗原提示細胞を適当な培地内で培養すること等により行う。また、被検物質が水溶性でない場合には少量のDMSOやエタノールを加えて可溶化した後に、これを例えば培養ディッシュの底部で乾燥させること等により添加したDMSOやエタノールを除いた後に、抗原提示細胞を添加して培養する方法等が好ましく用いられる。被検物質の量や、抗原提示細胞培養液への添加の順序、及び添加量等は被検物質、及び抗原提示細胞の種類によって適宜選択することができる。

【0054】被検物質を提示した抗原提示細胞、本発明のNKT細胞の反応は、これらを適当な培地中で適当時間培養することにより行うことができる。具体的には、例えば、1~5×10⁵個のV α 19NKT細胞に対し、被検物質を提示した細胞をその0.1~20倍加え、1~5日間培養する方法等が好ましく用いられる。また、解析するべき該細胞に現れる表現型としては、產生されるサイトカインの種類、及び量が挙げられる。これらの解析は上記した方法と同様に行うことができる。

【0055】また、TCRを介した刺激依存的な活性の調節物質のスクリーニングは、例えば上記(6)で作製したV α 19NKT細胞のTCRに対する抗体と被検物質を競合させ、被検物質による該抗体とTCRとの結合性の阻害度を指標として行うことができる。かくして本発明のNKT細胞の生物活性を調節する物質はこれが本発明のV α 19NKT細胞の生物活性を制御する性質を有することを利用して、免疫調節剤の有効成分として用

いることができる。さらに本スクリーニング法により選抜した物質を調製し、これを上記(7)に記載した方法と同様の方法により製剤化することにより、上記免疫調節剤を製造することができる。この免疫調節剤の投与量については、症状、年齢、体重等によって適宜選択することができる。

【0056】(10)V α 19トランスジェニック動物を用いた抗アレルギー薬のスクリーニング方法
上記(5)で得られたV α 19トランスジェニック動物は、このイムノグロブリンEの発現量が野生型に比べて増大している。そこで、該動物に被検物質を投与し、該動物体内のイムノグロブリンEの発現量の変化を解析し、該発現量を調節する作用を有する物質を選択することによれば、この物質を抗アレルギー薬として用いることができる。被検物質としては、上記(9)に記載のものが挙げられ、これらのV α 19トランスジェニック動物への投与量、および方法等は、動物種、年齢、体重、あるいは被検物質の種類等によって適宜選択される。また、イムノグロブリンEの発現量の測定方法としては、ELISA法、ELISPOT法、プランク法(免疫研究法ハンドブック、藤原大美、淀井淳司編著、中外医学社)等が挙げられる。ここで、該動物のイムノグロブリンEの発現量を抑制する活性のあるものは抗アレルギー薬の有効性分として用いることができる。さらに本スクリーニング法により選抜した物質を調製し、これを上記(7)に記載した方法と同様の方法により製剤化することにより、上記抗アレルギー薬を製造することができる。この抗アレルギー薬の投与量については、症状、年齢、体重等によって適宜選択することができる。

【0057】

【実施例】実施例1 非V α 14NKT細胞を含む細胞分画の取得

CD1d-/マウス(Smiley, S. T., et al., Science., 275, 977-979 (1997); ハーバード大学医学部のM. J. Grusby博士より供与された)とC57BL/6マウスとの交配をくり返して得られたNK1.1+/H-2bマウスの肝臓を取り出し、金属メッシュでこし、細胞懸濁液を調製した。これをDME培地(GIBCO BRL社製)で希釈して肝臓一つあたり10mlとし、700×gで5分間遠心した。上清を吸引除去し、沈殿を40%パーコール液(Pharmacia社)に懸濁した。

【0058】これを80%パーコール液(Pharmacia社)に重層し、900×gで15分間遠心分離した。ここで40%-80%パーコール液の界面にある細胞をパスツールピペットを用いて回収した。これをphycoerythrin(PE)結合抗NK1.1抗体(PK169; Pharmingen社製)及びfluorescein isothiocyanate(FITC)結合抗TCR $\alpha\beta$ 抗体(H57-597; Pharmingen社製)を使用して選択した。選択した陽性細胞を限界希釈法にてクローニングした。

armingen社製)で2重免疫染色し、NK1.1+、TCR $\alpha\beta$ +細胞をフローサイトメーター(FACScan; Becton Dickinson社製)にて分離、取得した。

【0059】これらの細胞群のCD4、及び8コレセプターの発現を、フローサイトメーターを用いて解析したところ、NKT細胞について既に報告(Dang, Y., et al., J. Immunol., 166, 3641-3744 (2001))のあるとおり、CD8陽性、CD4、及びCD8共陰性のものがほぼ同数存在し、それらが大勢を占めていた。

【0060】実施例2 非V α 14NKT細胞由来の融合細胞の作製

上記実施例1で用いたものと同様のマウス(CD1-/; NK1.1+, H-2b)の肝臓から実施例1の方法と同様にして5×106個のNK1.1+, TCR $\alpha\beta$ +細胞を得た。これらを1μg/ml抗TCR $\alpha\beta$ 抗体(抗体名; Pharmingen社製)、20ng/mlリコンビナントIL-7(Upstate Biotechnology)を含むDMEM培地5ml中で2000RのX線を照射したC57BL/6マウス脾臓単核細胞、5×106個と共に37℃、10%CO2条件下で2日間培養した。その後25ユニット/mlリコンビナントIL-2(Boehringer Mannheim社製)を加え、同条件下でさらに2日間培養した。これらの細胞をShimamura, M., et al., Eur. J. Immunol., 27, 1576-1579 (1997)に記載されている常法にしたがってT細胞腫瘍株BW5147のTCR mRNA発現のない変異株(Born, W., et al., Res. Immunol., 7, 279-291 (1988))と細胞融合させた。HAT選択の後、さらに培養し、増殖した細胞株についてfluorescein isothiocyanate(FITC)結合抗TCR $\alpha\beta$ 抗体(H57-597; Pharmingen社製)を用いて染色し、TCR $\alpha\beta$ 陽性細胞をフローサイトメーター(FACStar; Becton Dickinson社)を使用して選択した。選択した陽性細胞を限界希釈法にてクローニングした。

【0061】実施例3 非V α 14NKT細胞由来融合細胞の解析

(1) TCR α 鎖の構造解析

上記実施例2で作成した融合細胞株からISOGEN(ニッポンジーン社製)を用いて添付の説明書に記載されている方法に準じてTotal RNAを取得し、さらにこれらを鋳型として作成したcDNAを環状化した後、5'-RACE Core Set(TAKARA社製)を用いて5'-RACEを行った。具体的な操作は以下の通りであるが、詳細な条件等は上記キットに添付されたマニュアルに記載されたものに準じて行った。

【0062】上記各融合細胞株から得られた total RNAを錆型として、C α 鎖をコードするDNA配列に相補的な配列番号3に記載のリン酸化プライマーを用いてDNA合成を行った。さらにこのRNA-DNAハイブリッド鎖のRNA部分をRNaseH(上記キットに添付)を用いて分解し、残った1本鎖のcDNA鎖をT4 RNA Ligase(上記キットに添付)を用いて環状化した。この環状DNAを錆型として、C α をコードするDNAの5'末端から5'側(J α 側)へ向かうプライマーとして配列番号4に記載のもの、またC α をコードするDNAの3'末端から3'側(V α の5'側)へ向かうプライマーとして配列番号5に記載のものを用いてPCRを行った。

【0063】さらに増幅されたDNAを錆型として、上記で用いたプライマーより内側にずらした配列を有するプライマー(5'側:配列番号6、3'側:配列番号7)を用いてPCRを行った。ここで増幅されたDNA断片をアガロースゲルによる電気泳動で分離し、ゲル中からQIAEX(Qiagene社製)を用いて抽出し、T-easyクローニングベクター(Promega社製)にクローニングした。これをM13、及びM13Revプライマー(TAKARA社製)を用いてThermo Sequenase Fluorescent labelled primer cycle sequence kit(AmerchamPharmacia社製)により反応させ、オートDNAシーケンサー(HITACHI:SQ3000)を用いて塩基配列を決定した。

【0064】解析した融合細胞21株のうち11株で均一なV α 19.1-J α 26鎖を発現していることが判明した(表1)。またV α 19.1-J α 26鎖発現株におけるV-J結合部位の塩基配列、及びアミノ酸配列を図1にまとめた。生殖細胞型の配列をそのまま使用した株(NB103、NB201、NB204、NB206、NB213、NB403)に加え、V-J遺伝子再構成部位にアミノ酸の変異を起こした株も存在した。しかしアミノ酸変異は1残基に限定され、しかも配列の長さはすべて一定であり、この系譜の細胞発生時の正の選択が極めて厳密に起こっていることが示唆された。これらのV α 19.1-J α 26鎖発現株を、以下「V α 19NKT細胞」と総称する。

【0065】(2) TCR β 鎖の構造解析

V β に対する15種類のFITC化された特異抗体(Mouse V β TCR screening panel:Pharmingen社)を用いて、上記(1)でV α 19.1-J α 26鎖を発現していることが確認された融合細胞株を免疫染色し、フローサイトメトリー(FACStar、Becton Dickinson社を用いた)によりV α 19.1 α 鎖と対をなす β 鎖のV β を使用を決定した(表1)。その結果V β 8及び6の

使用頻度が高いことがわかった。 α 鎖と併せ、この細胞種のTCRの構造は極めて特殊であり、認識する抗原も特定の物質に限定されることが示唆された。

【0066】

【表1】
(表1)

融合細胞株	V α 19-	V β
	J α 26	
NB102	-	2
NB103	+	2
NB104	-	a)
NB110	-	4
NB115	+	a)
NB116	+	6
NB201	+	7
NB202	+	6
NB204	+	8
NB206	+	4
NB208	-	8
NB209	-	6
NB211	-	8
NB212	+	5
NB213	+	8
NB215	+	6
NB308	-	8
NB403	+	8
NB404	-	6
NB405	-	8
NB408	-	8

表中a)は、V β 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、及び14以外のV β 鎖を有することを示す。

【0067】実施例4 V α 19NKT細胞株のTCRへの刺激に応答したサイトカイン産生能

V α 19NKT細胞の性質の一端を明らかにする目的で、上記実施例3(1)でV α 19.1鎖を発現していることが確認された融合細胞細胞株を利用してそのinvariant TCRへの刺激に応答したサイトカインの分泌パターンを調べた。各融合細胞を96穴平底培養プレートにPBSで10 μ g/mlに希釀した抗CD3 ϵ 抗体(145-2C11:Pharmingen社製)を加え、4℃で18時間培養した。PBSで2回洗浄したのち10⁵cells/mlの濃度とした細胞株浮遊液を100 μ lずつ加え(10⁴個/well)、2日間培養した。この培養上清100 μ lに分泌されたIL-4、及びIFN- γ の量をELISA法により定量した。3, 3', 5, 5'-Tetramethyl-Benzidine(TMB) Liquid substrate system for ELISA(SIGMA社製)法で定量した。測定にはBD OptEIA set(Pharmingen社製)を用いてを行い、条件等も該キットに添付のマニュアルに従って行った。また、対照としてV α 14NKT細胞から実施例2と同様にして作成した融合細胞株(Shimamura, M. et al., Eur. J. Immunol. 1, 27, 1576-1579(1997))、及び

n e g a t i v e c o n t r o lとして実施例2で使用したTCR陰性のT細胞腫株BW5147を使用した。その結果を図2に示した。V α 19NKT細胞株ではいずれもIL-4/IFN- γ 分泌のバランスがV α 14NKT細胞株と比較してIL-4側に偏っていることが判明した。

【0068】実施例5 V α 19-J α 26導入DNAの調製

Shimamura and Huang, FEBS Letters 516:97-100 (2002)に記載の方法に従って樹立したV α 19-J α 26再構成遺伝子発現ハイブリドーマ株(NB403)からV α 19-J α 26を含むTCR α 鎖の作製に必要なcDNA断片を単離し、これにV α 8.4のプロモーター領域及びC α 、 α 遺伝子エンハンサー領域をライゲーションして配列番号8に示す導入DNAを作成した。その模式図を図3に示した。以下に詳細に説明する。

【0069】NB403からISOCEN (ニッポンジーン社)により単離したRNAから、cDNA合成キット (Time Saver cDNA Synthesis Kit; Amersham Pharmacia Biotechnology社製) を用いて二本鎖cDNAを合成し、EcoRIによる消化と脱リン酸化処理を行ったλZAPII vector (Stratagene社製) に挿入してパッケイジング後、大腸菌XL-1 blue MeF' (Stratagene社製) に感染させて、phage cDNAライプラリーを作製した。次に、作製された独立クローニングを含むphage cDNAライプラリーを、V α 19-J α 26-C α を含むDNA断片 (配列番号: 9) を用いてスクリーニングした。陽性クローニングに含まれるcDNAを、ペルペーファージに感染させてpBluescript II SK(-) (Stratagene社製) にクローニングした株(pGL α)を得てオートDNAシーケンサー(HITACHI:SQ3000)を用いて塩基配列を決定した。その結果、リーダー配列(L)とV α 19-J α 26がスプライシングしているmRNAに基づくcDNAクローニングが得られたことが確認されたので、これを基に以下の導入DNAを調製することとした。

【0070】次にLとV α 19間のインtronをクローニングするため、インtron上の配列番号10およびV α 19上の配列番号11のプライマーを用い、NB403ゲノムDNAを鑄型にPCRを行い、増幅されたDNA断片はpGEMT-easyプラスミド (Promega社製) にライゲーションしてクローニングした(pLV α)。上記で取得されたV-J領域のcDNAクローニング (pGL α) とこのゲノムクローニングをV α 19上とプラスミド上のPstIサイトを利用して組み換え、V α 19-J α 26の両端をgerm-line配列のインtronで挟んだゲノムがpBluescript II SK(-)に組み込まれたクローニング (pVJ α)を得た。

【0071】次にリーダー配列を含むプロモーター領域はAsada, A., Immunology, 101, 309-315(2000)に記載のとおり、BG8株から作成したV α 8.4を含むゲノムDNAクローニング (pG α 1) から調製した。pG α 1のLとV-J間インtron上のAatIIサイトとプラスミドpBluescript SK

(-)上のNotIサイトの間を切り出し、代わって上記V α 19-J α 26部分ゲノムクローニング(pVJ α)からインサートをEcoRIで切り出したものをプラントエンドライゲーションして置き換えた。このinsertをSmaI, SacIIで切り出し pBluescript KS(+)に再度組み込んだ(pLVJ α)。次にTCR C α 、エンハンサー領域のゲノムクローニング (pC α E, Sha, W.C. et al. Nature, 335: 271-274(1988)) をpBluescript SK(-)からSmaI, NotIで切り出し、これをEcoRV, NotIで切り開いておいたpLVJ α に組み込み最終的に配列番号8に示す導入DNAを作成した。

【0072】実施例6 invariant V α 19-J α 26 TCRトランスジェニック(Tg)マウスの作成

得られたベクターからSalI, NotIで切り出した導入DNAとして用いるインサートは低融点アガロースゲル電気泳動に供して該当するバンドを切り出した。抽出後エタノール沈澱によって精製したものをDulbecco's PBSで2 μ g/mlの濃度に再溶解し、さらに遠心分離を行った上清をマウス受精卵へのマイクロインジェクションに用いることとした。採卵用のC57BL/6系統雌マウスに卵胞刺激ホルモン (妊娠馬血清性性腺刺激ホルモン; PMSG) 及び黄体形成ホルモン (ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン; hCG) をそれぞれ個体あたり約5単位、48時間間隔で腹腔内投与して過剝排卵させ、C57BL/6系統雄マウスと交配させた。膣栓確認後、交配後1日目の卵管からマウス受精卵 (初期胚) を採取し、上記実施例5で得られた導入DNA溶液を、該受精卵の雄性前核に2plずつマイクロインジェクションした。これを2細胞期までWhitten'sの培地中にて37°Cで培養し、偽妊娠の雌ICR系マウスの輸卵管に戻して個体を発生させ、帝王切開により仔マウスを取り出した。得られた仔マウスは、すぐに仮親につけて離乳期まで育てた。Tgマウスのスクリーニングはサザンプロット法を用いた。上記の方法で作製されたTgマウスは、出生後1~3週経過したところで尾の先を切り取って、高分子DNA抽出法によりゲノムDNAを抽出し、各DNA 10 μ gを1mM spermidine存在下で一晩EcoRIで消化した後、エタノール沈澱を行って濃縮した。沈澱として得られたDNAは、TEバッファー (10 mM Tris-HCl(pH8), 1 mM EDTA) に再溶解し、アガロースゲル電気泳動法を用いて分離精製してサザンプロットに用いた。サザンプロットに用いる分析用プローブは上記配列番号8に示す塩基配列の塩基番号2477~2709番のDNA断片を用いた。これをランダムプライマー法 (Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2; 宝酒造社製) により³²P-標識して分析用プローブとした。その結果の一部を図4に示したが、計5系統のFounderを得た。交配によりF1個体を得ることができた3系統のうちサザン分析の結果から予測される導入DNAのコピー数および後記するFACSによるリンパ球分析の結果から最もV α 19NKT細胞の発生頻度の高いラインを以下の実験に使用することにした。

【0073】実施例7 invariant V α 19-J α 26 TCRトランシジェニックマウスにおけるV α 19 NKT細胞の発生
 実施例6で得られたトランシジェニックマウスにおける導入DNAに含まれるTCR α 鎖の発現はプロモーター、エンハンサーにTCR α 遺伝子それ自身のものを使用したためにT、NKT細胞系列に限定される。先ず肝臓リンパ球における導入DNAの発現をRT-PCR法により解析した(図5)。実施例6で取得されたトランジーンプラスおよびマイナスのマウスより単核球細胞を肝臓、胸腺、脾臓、骨髄から調製した。肝臓からの単核球細胞の調製は文献にしたがって(Shimamura and Huang, FEBS Letters 516:97-100 (2002)) Perco11密度勾配遠心法によった。その他は常法によった。これらの細胞より、IS OGEN(ニッポンジーン社製)により単離したRNAから、RNA PCRキット(RNA PCRKit(AMV)Ver2.1:Takara社製)を用いてDNAとRNAのハイブリッド鎖を合成し、これを鋳型としてV α 8.4リーダー配列(配列番号12)とJ α 26配列上(配列番号13)のプライマーによりRT-PCRを行った。また、コントロールとして、TCR α 鎖定常領域(C α)の5'端(配列番号14)と3'端(配列番号15)の塩基配列を有するプライマーを用いて同様にPCRを行った。これらの反応液をアガロースゲル電気泳動により分離した結果を図5に示す。図中、Tg+は、トランシジェニックマウス由来のRNAの結果を、またTg-はトランジーンネガティブのマウス由来のRNAの結果を示す。レーン上の数字は、鋳型の量(μ g)を示す。C α の分析結果よりTg+およびTg-マウスから調製した試料のT細胞の数はほぼ対応していることが示されたが、このときに、導入DNAの一部はトランシジェニックマウス由来のRNAから合成したcDNAを鋳型とした場合にのみDNA断片が増幅され、導入DNAに含まれる遺伝子の強い発現がみられた。

【0074】次にV α 19 NKT細胞の発生をFACSで調べた。V α 19トランシジェニックマウスおよびB6マウスより単核球細胞を肝臓、胸腺、脾臓、骨髄から調製した。肝臓からの単核球細胞の調製は文献にしたがって(Shimamura and Huang, FEBS Letters 516:97-100 (2002)) Perco11密度勾配遠心法によった。その他は常法によった。得られた単核球細胞は抗Fcレセプター抗体(2.4G2:ファーミンジエン社製)で処理後、FITC標識抗TCR α β (ファーミンジエン社製)、PE標識抗NK1.1抗体(ファーミンジエン社製)で2重蛍光染色後FACScanフローサイトメーター(Becton Dickinson社製)を用いて分析した(図6)。図中、グラフの縦軸はNK1.1の発現量を、横軸はTCR α β 鎖の発現量を示す。また、上段のグラフは、トランシジェニックマウス由来の細胞の解析結果を示し、下段のグラフは野生型マウス由来の細胞の解析結果を示す。また、左端から順に肝臓、胸腺、脾臓、骨髄由来の細胞の解析結果を示す。いずれの臓器においてもTCR α β 、NK1.1共陽性のNKT細胞の割合は上

記トランシジェニックマウスでも増加はみられなかつた。しかし上記トランシジェニックマウスにおいては、導入DNAが発現しているV α 19NKT細胞と考えられるTCR α β の発現強度の増強された細胞が数多く発現していたが、これは野生型B6マウスには少数しか存在しない。

【0075】次にトランシジェニックマウス、B6マウス、CD1遺伝子欠損マウスの肝臓単核球を同様の方法でFITC標識した抗CD4あるいはCD8とPE標識した抗NK1.1抗体で2重蛍光染色後FACS分析した(図7)。その結果、トランシジェニックマウスではCD8発現NKT細胞(V α 14 NKT細胞は、CD8陰性である)としてV α 19NKT細胞が多数発生していることが明確となった。これに対して野生型B6マウスではV α 14 NKT細胞が主としてCD4発現細胞として発生し、これはCD1遺伝子欠損マウスでは消失していることは文献(Bendelac,A., et al., Science, 268:863-865 (1995))の示すごとくであった。

【0076】実施例8 トランシジェニックマウスNKT細胞のサイトカイン分泌の解析

V α 19NKT細胞の機能を知るうえで、invariant TCRからの刺激に応答したサイトカインの分泌を調べることは有力な情報となる。野生型マウスでの発生数の少ないV α 19NKT細胞の解析は困難を伴う。このTgマウスでは肝臓のNKT細胞の約50%がV α 19NKT細胞であることからこれを材料とした。対照としてV α 14 NKT細胞が大半を占めるB6マウス肝臓NKT細胞を用いた。両マウス肝臓単核球をPerco11密度遠心法で調製し、ビオチン標識した抗NK1.1抗体(Pharmingen社製)で染色後、磁気ビーズを結合させた抗ビオチン抗体(Pharmingen社製)で標識し、MACS法(Miltenyi Biotec GmbH, Germany)にてNK1.1発現細胞を調製し、以下の実験に供した。96穴プレートに抗CD3抗体(2C11, Pharmingen社製: 100マイクログラム/m1)をコートし、その上で 2×10^5 個の細胞を培養してTCRからの刺激を与え、そのとき培養上清に分泌されたIL-4、IFN- γ を実施例4に記載の方法と同様にELISA法で定量した。抗体はPharmingen社製のものを使用した。トランシジェニックマウスNKT細胞では培養1日目、2日目のサイトカイン濃度は、IL-4の濃度が1.1、1.5 ng/m1であり、IFN- γ の濃度が8.2、4.5 ng/m1であった。一方、B6マウスNKT細胞ではIL-4の濃度は培養1日目が0.86、2日目が0.59 ng/m1であり、またIFN- γ 濃度は培養1日目で6.9、2日目で42.0 ng/m1であった。おのおののNKT細胞の培養1日目、2日目におけるIL-4とIFN- γ の比を図8に示した。図中Day 0-1で示すレーンは培養1日目の結果を示し、Day 1-2で示すレーンは培養2日目の結果を示す。図から明らかなように、トランシジェニックマウスから得られたNKT細胞ではB6マウスのNKT細胞と比較してIL-4に分泌が偏っていることが示唆され、トランシジェニックマウスのNKT細胞はV α 19

NKT細胞が多いことが示された。これはそれぞれのハイブリドーマ株を用いた私達の分析結果（実施例4）から予測されたとおりであった。

【0077】実施例9 V α 19トランスジェニックマウスにおける抗体産生

実施例6で取得されたV α 19 NKT細胞が過剰発生するV α 19トランスジェニックマウスの免疫応答を解析した。ポリクローナルに抗体産生を誘導する抗原として特にイムノグロブリンE（IgE）産生誘導抗原として常用されるヤギ抗マウスIgD抗血清（Finkelman, F. D., et al., J. Immunol., 126, 686(1981)）200μlをマウスの腹腔内に投与して、7日後の抗体産生を調べた。この結果を図9に示した。図中、縦軸は血清中のIgE量を示し、グラフ左の目盛りは、抗IgD抗原による刺激前の値を示し、右側の目盛りは抗原刺激後の値を示す。また、白丸で示すグラフは、トランスジェニックマウスの結果を示し、黒丸は野生型マウスの結果を示す。

【0078】図から明らかのように免疫前の血清IgEレベルは上記トランスジェニックマウスにおいて野生型マウスのレベルより高くなっていることが判明した。一方抗原を免疫後1週間でのIgEレベルは逆にTgマウスでは野生型に比べ著しく低下していることがわかった。このことからV α 19 NKT細胞は通常は図8に示したサイトカ

イン分泌パターンからも予測されるとおりTh2環境への偏移に寄与しIgE産生レベルを上昇させるのに寄与するが、ひとたび抗原にさらされた時には逆にTh2環境を抑えてTh1/Th2バランスのhomeostasisに寄与することが示唆された。このことからV α 19 NKT細胞のI型アレルギー抑制効果が期待される。

【0079】

【発明の効果】本発明により、それまでにNKT細胞として知られていたV α 14 NKT細胞とサイトカインの产生パターンの異なる新規なNKT細胞、該細胞由来の融合細胞が提供される。該細胞は保存された構造のTCRを有していることから、特定の抗原（リガンド）を有することが予想される。本発明の細胞はこのリガンドのスクリーニング方法を提供することにより新たな免疫調節剤の提供も可能とするものである。また、本発明によれば、上記NKT細胞が有するT細胞レセプター α 鎖をコードするDNAをT細胞特異的に発現するように導入した非ヒト哺乳動物が提供される。該動物は、野生型に比べて血清中のIgE濃度が高いため、抗アレルギー薬のスクリーニングに有用である。

【0080】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> Mitsubishi Chemical Corporation
<120> Novel NKT cells
<130> J09279
<160> 15
<170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
<211> 128
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 1
Met Leu Gln Met Trp Gly Phe Val Leu Tyr Leu Phe Leu Thr Val Gly
      1          5           10          15
Gly Ala Ala Gly Gln Gly Val Glu Gln Pro Ala Lys Leu Met Ser Val
      20          25           30
Glu Gly Thr Phe Ala Arg Val Asn Cys Thr Tyr Ser Thr Ser Gly Phe
      35          40           45
Asn Gly Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Arg Glu Gly Gln Ala Pro Val Phe
      50          55           60
Leu Ser Tyr Val Val Leu Asp Gly Leu Lys Asp Ser Gly His Phe Ser
      65          70           75          80
Thr Phe Leu Ser Arg Ser Asn Gly Tyr Ser Tyr Leu Leu Leu Thr Glu
      85          90           95
Leu Gln Ile Lys Asp Ser Ala Ser Tyr Leu Cys Ala Val Arg Asp Ser
     100         105          110
Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ser Gly Thr Lys Leu Ile Ile Lys Pro

```

31

32

115	120	125
<210> 2		
<211> 110		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<300>		
<303> J. Exp. Med.		
<304> 189		
<305> 12		
<306> 1907-1921		
<307> 1999/6/21		
<400> 2		
Gln Asn Ile Asp Gln Pro Thr Glu Met Thr Ala Thr Phe Gly Ala Ile		
1	5	10
Val Gln Ile Asn Cys Thr Tyr Gln Thr Ser Gly Phe Thr Phe Asn Gly		
20	25	30
Leu Phe Trp Tyr Gln Gln His Ala Gly Glu Ala Pro Thr Phe Leu Ser		
35	40	45
Tyr Asn Val Leu Asp Gly Leu Glu Glu Lys Gly Arg Phe Ser Ser Phe		
50	55	60
Leu Ser Arg Ser Lys Gly Tyr Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Glu Leu Gln		
65	70	75
Met Lys Asp Ser Ala Ser Tyr Leu Cys Ala Val Lys Asp Ser Asn Tyr		
85	90	95
Gln Leu Ile Trp Gly Ala Gly Thr Lys Leu Ile Ile Lys Pro		
100	105	110
<210> 3		
<211> 12		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic		
<400> 3		
atcttggcag gt		12
<210> 4		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic		
<400> 4		
aagtccgtga acaggcagag		20
<210> 5		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic		
<400> 5		
ctggaacgtt catcaactgac		20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
<400> 6
ctggtagacaca gcaggttctg 20
<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
<400> 7
gctatggatt ccaagagcaa 20
<210> 8
<211> 12035
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 8
tcttagagcta gaattttaa taagaaagaa caatagtctg atagctgttag tcaccatgat 60
ctacatttgc ttttaatttta attggcaga acaatgaagc cttctttccc actttatttga 120
tattttctgtg gctgtatttg gatggtgagt taatattttg ggccacagaa tggtcagtgt 180
gtatttgaga catctagggg tggccatct tactcagatt ttctcttagtt accataaaaa 240
aggagaaaact tggaaagtga tggccacaca gccttctcc ttctttcca ttcttctgca 300
tagagatgag ccaaggcaag caggtggcgc agcttccttc catcctgaga ttcaaaaag 360
ggaccaacac tctcaaaaac tgcatttatg taaaacaatgc ctcactctgc ttcttttgtt 420
ataagcaaga acctggaaaa catcctacat tcgttatttga cattcggttga aatatggaaa 480
gaaagcagag ccaaagatttt atagttttac tggaaataagaa atccaaacat ttctccctgc 540
acaacacaga caatcggcct caagactaag ccatgtactt ctgtgtgtt agtgcacagt 600
tttccatggc tcttagtagcc tggcccttcaaa cctggccgtga ggcctggatc cccatctaca 660
tcctgcattt cagggccttcc agtgcacat ttgtcagggg ttagttttaa gagccatctc 720
tactgttagac ataaaaaacac aaaatttagaa tggtagcttc aactcactcc actccatttta 780
ggacaaattt ctccatctt cttttttttt aaatttagttt taaaatttggaa atataatttt 840
aataactttcc ttcttgtagc acatagaggt tatgagagaa cagaactcat tatgctgcaa 900
agaagaaaag actgttagctg actcggcccc atatggaca tctgtatccc acaccctct 960
cccttagccat tcagtgcactc agagggttattt cttttttttt tttttttttt tttttttttt 1020
tgttaggggggtt ggttgcattc aaagaaggcag tggcccttcc tttttttttt tttttttttt 1080
atgtgaatttcc agagagggttgc acatgcactc taagtatttgc aaaggatcaa ggcggaaaa 1140
ttccatcaca gagaaggaaatggcattc ccacccctttt tttttttttt tttttttttt 1200
gggttgcattc ctacccttcc atggccatcc cttttttttt tttttttttt tttttttttt 1260
tataacacaaa aacttgcattc gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1320
ttgtatgaaa cactgaatct ttcaaaagact ggaaagaaca gatggatata accaaaattt 1380
attgcataat atttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1440
tcttaattttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1500
catagtttcattt cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1560
tgggttgcattc tccaaatgttta tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1620
ggggaaaccatc cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1680

actaacatc agagactctg tgcagacaga ggtccctgtc tgtgagttag gagtgagg 1740
agatccctgca ggaggattgc cctgtgagaa tggcactc agggaccaag tgtcatttct 1800
tccatgaaca tgcacccctgt cacctgctca gtctttgtc tcctccataat gctcgtt 1860
tcacattgtc ctctagggtt aatgaattca ctgtgattc atagagaaca tggcttagg 1920
tttcaaaaat aattttctc cagctaaata atgcacatt ttataatgaa aaaagccctt 1980
gctatttagat atttccctt ctttcttaat ttcttatttta ttatatttttta 2040
tttatttttta tatttatcta tctatctatt taatgtctt tgagacaggg tttctctgt 2100
tagccctggc tgcctggaa ctcaactctgt agaccaggct ggccttgaac tcagagatcc 2160
tcctgcctt gacccctgtc gtgtgggat caaaggcgtg caccatcatc tcctgtggat 2220
agatgccttc ttatgtgtc cccactgtt tggccttct tgaatagc agctgtcatt 2280
gttaccactg tttctgacac tcattgtga tcttggaaac tccctgttac tctaagttt 2340
cctggaccac atgaaagcat ggcattttt aaaaattaaat tttaaacaat tcaacgtgg 2400
aataatctat ctacagcatt tccacgcctc cttccccct gctaattttt ccgtgtctc 2460
gttaggtctg caggacaggc tggcggcag cctgccaat tggatgtctgt ggaggaaacc 2520
tttgcctgg tcaactgcac atacagcacc tcagggttca acgggttac ctggtaccag 2580
caacgtgaag gccaaggcccc tggatgtt tcttgcgtt tttggatgg tttgaaggac 2640
agtggccatt tctccactt cctgagccgc tcgaatgggtt acaggatccct gctctgaca 2700
gagctccaga tcaaagactc tgcctcatac ctctgtctg tgagggtatag caactatcg 2760
tttgcctgg gctctgggac caagcttataat taaaaggccag gtaagtcctt gatataatgac 2820
agtaagaag aaggcaactgg ctgaataatg catgaagtgtt agcatgcaaa ttgtatttt 2880
aagaacaatc cggccctgtc gagacaatgc actcagccg tgggtcttc gctccagag 2940
aaaggcgttgc tcaagccacca actctctgtt ttaatatagc tgcttccaga atgaataatg 3000
cttgactggc cttctaaaat agcagagcca agtgggtgtt ggatgtctaa ttccctctgg 3060
tatgtttttaga attggccgccc accgggctgc aggaattcga tgggggatcc ggatccagct 3120
ggggatccgc attgccaagg ccaccctgg tggctctgtt gatcgtttaa ggactgtggg 3180
agacccacgg gggaggagc tttggatcac agccctgtc gaaactctt aggtggccg 3240
ctgtgttaat ccctccagcc ggcctcatac gaccgtggag ggcgtggggaa aatgtctga 3300
gagagtccaca taaaaacaa aatccctgg agaaaaggaaa gaattgtctt caggtacac 3360
ccgctttcctt ggaataaaaga gacagtgtt tgggttgc aagtggatg ttttcatgtt 3420
gaaagccagg cacgttgc tggatgtt cagtgccgg tggatgtttt actcggttat ttttatttga 3480
aaaaaatatgc atttctcaga acaggctgtt gtccctctt caggtaaaaa ttctgcgact 3540
tcagctgtt gttgatttta tccaggccg ccaagataaa ttgttagac agggctctgg 3600
tgtgagtgtt attcaaaaaca ttatcaacg agagaggaaa aatggccgg tagtgtgaga 3660
gactttccaa cttaatgtt aaatatcaca cgccctcggt tctcaccaac gtccagccct 3720
cctgggggag agtactctgtt agaagacatc taagtctctg ttttctaaatc ttgtttttgt 3780
cctgcctttttaaaaatgtt tgactggacc cactggggttt ctgaatgtt tggatgttag 3840
aaaaatgaca agatggttta gtgggtccac ctccctttt ggtttccca gatgccagaa 3900
aggacccctgtt ggagaggagc tactgaaagc tagagatctt ggcgtggact catgacttgt 3960
gcctgtccctt aaggccctgtt ccacatggg cagcttagatc ctggctgtc atttccatg 4020
tgaagtctgtt gaacaagact ggctgttcca gaggttccg ctcttgcctt tcaactggcat 4080
ctgagttctg acctaagttt ggaccccaa aaaaatctt aacatcgtt ctctggccc 4140
acagacatcc agaacccaga acctgtgtt taccagttaa aagatccctg gtctcaggac 4200
agcaccctctt gcctgttccac cgactttgtc tcccaaataatc atgtgcccgg aaccatggaa 4260
tctggaaacgt tcatcactgtt aaaaactgtt ctggatgtt aagctatggaa ttcaagagc 4320
aatggggccca ttgcctggag caaccagaca agcttcaccc tccaaagatat cttcaaaagag 4380
accaacgcctt cctacccctt ttcaggttgc tggatgttcca gaagtctctt cctggctt 4440
atctatgtt tccaaaagct gctttgggtt atctcaccctt catcattttt cagcaaaaatc 4500
cacatccctgtt gtcactaagg agtctaaacgg gtcaccaag cagacaagag aacatgacac 4560
aggacattgg cccagcattt gtcactaataat tctggaggctt accttccctgtt cttcttgc 4620
gcaagtgcc ttctctgttcc cccaggccac agtttccattt cccttccctgc ccataccccc 4680

cccacccacc cccagccgccc tgccctgact tctatgtctg ccaagtagtg tgagtagaca 4740
 agtcagatga ggaggaggga gtgccactct aatccggag gaccatccgt cagcagaggg 4800
 acatgtaaat gacaccaggc tgcaattaat atatgcaata actcagagtt aaggcaagaa 4860
 cagctcagag aaaggctcg agaaaatgct atcacactac aagttaatag ataagaaggg 4920
 accagccctg cctggggcca gagaggagcc tgcagaagc taagaaagga gaatccgaga 4980
 ataaggagaa gctgcagggaa atggattgtt agccatagac aggggggtca gatcacaggt 5040
 agaggcaaga gaagcagacg tc当地atgtca tcatcaccta cacagaaagt tcaaggccag 5100
 cctggactac cc当地agaccct gtctccaaa acaactaaat aaacataagg ttgagttgg 5160
 tgttagaaggc agactgtaga tccagcagaa gacagagaac atagagagat gaagggagcc 5220
 ccaccagggt atggcgggac tccagcggcc aacagcactt aggttccaca gatagaacca 5280
 cacagagatt ggtcagtggtt catcaaggaa agtggcagag catctcggtc gatgggacct 5340
 tatactaagc aagagataat aaaggagcaa atttgggtat caacactatt gtggggaggt 5400
 gtacatgaaa atacatggcc ctggtaactg tgaatatgtc ttgctgtctt tacggactc 5460
 tagactgaaa cctccagggtc ttgactttt gccc当地acgtc atacagcagc tactttgcac 5520
 agccctgtt tagtggaaaga ataaaagagt gccc当地aagc caggggtttt gccc当地tct 5580
 cc当地agata cc当地ggtaa tcatggcccc cagctctc ccagaggatc acagaaaagc 5640
 tgtgatatgt ttccctgacc aacaacctgt ggtggacag ttaacacgtc tc当地aatcta 5700
 agggaaatgtc ttgttttcc ct当地tagacg ttccctgttga tgccacgtt actgagaaaa 5760
 gcttggaaac aggttaagaga agggcttgac caacactgag tgatgttggg ggggtggggag 5820
 gggccaggtaa tgaccctttag tgccaggggg agggggggg gttggatctgg aggtggaaac 5880
 agcatttcca gtccctccca agcttcgcag ggtctgtctt gaatccccag cacggtaac 5940
 gtc当地tttcc attcttaagta ct当地acaagc ggtgcctcca gtttccacaag gccagtgagt 6000
 cactctcggg ccttgggtc tcttggattt gctccctgtt gagaatagcc aaagaaaacc 6060
 acttc当地atg cc当地gttga acttggatggtt cc当地tccagg gcagccctga actaacctt 6120
 tc当地ctatg gacactggcc ctctctgtat ct当地ggggaa ttcccttctt gaaaggaaat 6180
 agaactcaca tagcctcagg caaaggctt gtctcaacgc cacctcgatt ccacgtgact 6240
 agttactgag tc当地cacatc tgggtttca ct当地ggggcc caggtcttgc ccattatgac 6300
 aagttctgaa catctaccac caccaccccc accccgacca cc当地ccctctt ct当地tacagg 6360
 cctc当地ataa ttatatgact aagtc当地ttt ggtggttttt gtctt当地aaac acaatgtct 6420
 taccctggag ggatatacaa atacccttgc ct当地gggtgtt gtgc当地aagc tcaaaagaaac 6480
 aaccctggag ttgaaagttac cc当地cccaa gcatgc当地aa cc当地cttgg gggaaatgcca 6540
 cagtgcttgc agttgttgc ct当地ccctctt atgc当地atc cgttaatggc taccacctt 6600
 tggtttaca gatataacc taaaacttca aaaccctgtca gttatggac tccgaatctt 6660
 cctgctgaaat gtagccggat ttaaccctgt catgacgttgc aggctgtgtt cc当地tggagg 6720
 taagaaggca tgaaaggctg gagaagactt aggggtgtt attcaggc当地 agacccaaacc 6780
 ctgagc当地aa atcccttgc gattttttaat ttgctt当地aa gtc当地aagc tggaccacca 6840
 gaacttttcc accccctacc cgttacaatg tggtaacactt ttgcaacactt gccctgaaac 6900
 acctggctg cagaacacaa ttccctcagg gaccttgc当地 cagcagc当地 tctccataaga 6960
 tactcagggtc atgtc当地ttt agaaatgtt gaaatgttggc caagtc当地tcatc当地 7020
 acagccaaag aacagaggag gagaagaaactc cggacccttgc tgc当地acgtt ccacgttct 7080
 ctggccctgc ttctggagggt gtacactccc ttccctgttgc ctttcccttctt agcaagctct 7140
 ctctgcttgc tattcaatgt tgc当地atactt attagccctc cacctggatc gaggcatcat 7200
 gttccctgg tc当地cttgc当地 cagcccttca gaaatttcatc ct当地atcacac ccctggagggt 7260
 ccttagtctc catgccaagc ctgacctctg tacttccatca ctccagggtt gcaagactgt 7320
 cagggcttgc ctcccaagct cc当地cttccctt cacccttgc当地 ctcccttcc aagccaaag 7380
 gagccctccc acctcgtaa gacggcttgc tgggggttgg ttggcccttgc ttcaacatcc 7440
 cacctggatc tcccaaggattt gtgagggagg ttgctggaga gcttaagactt gctgccc当地 7500
 cc当地ctcacttgc tgc当地gaccat tcacaaaaaa cggcaggggc gggcccttctt 7560
 ctggatctga agaccctcc cccatggcag actccctgtt aaaatctt ggagaatgtt 7620
 gtaaaaaaaaaa tatcggttgg tttttttttt tttttttttt gccc当地tttat ttttttaagc 7680

atccatgaag aaatgcata tactcttca tcaagggtga gaaattatct cattgtctag 7740
 accctcctgc tactgtgtt attgagccac attgtatatt attctgtgtt ccatgacatc 7800
 attaaagggtg attcagaaaa accaaaactg tgatcttatt tgactgtgtt tgggtgggg 7860
 catttacatg cagagagaaa ccgaagtacg tgcctatcac acctgcccag ttaccta 7920
 aaaccctctc cattcaacctt ctggatga cctcttaaaa attccactaa gtggccggc 7980
 gagtgatggc cgacacaccc taatcccagc acttgagagg cagaggcagg tggattctg 8040
 agttcgaggc cagccggc tacagaatga gttccaggc agccaggct acacagagaa 8100
 accctgtctt ggggggggtg tggggggatt ccactaagca agctgtacca agggccagg 8160
 agctccctt acaggggaga gtccccgctc atgccgcacc cattaagagg ctgaccgc 8220
 ggggctgtat ggcaggctc gacctgttagc tgaactttac cagtcaagga tgaggaatgt 8280
 cctccagggtt ctcacccact ggctcctgccc tccaggaca ccctgcctc cccatcagac 8340
 tgccttgcta ctgaacctgt gttctgcctt acaaattctac tgtctggac ttggccaagg 8400
 acagcaggca ttctcagctc ttctctggc tgagagtctc tgccttacaca gcccactgtt 8460
 cttggcagag agggagccctc tcctatcagt tcctttccc caagggcagg cagggattct 8520
 gatggaaaca cacttcagag accaactgt cacaccaaac gggagttactt actagttccc 8580
 aggactcccc cacccccacc cactgccacc accccagctt tccctggcacc aactgtgtgt 8640
 ctatgaccac actagccaga aatatgtcaa tcctcccagc tgtactccc aggcctgctt 8700
 cttctcatag agatggggctt gaccagctt cgagtgtatcg tccctccctc 8760
 ctgtgagctt cagggtcacc acccatgaaa tgtcagtttc gactggagac tacagaaaa 8820
 accccatgttc cctctcccg ccaccctga ttagagtgc cgcagaaccc cgtcatttct 8880
 aaactgcctc atctctggc cacaatgaag ccttctgaga ccagtgcacgg ggacggccctc 8940
 agggaaacacc accatgacag ggcacccctc acacacacac aggggaggag gggcgaagag 9000
 cctcaatccc acgcccctcc tcgaggtctc gacacgtac caaagactac cactgggat 9060
 ttcttttaat taaaccattc tcttccctgtt attagatgaa agtgcctatcg ggaaggtag 9120
 tgcagcaagc ctttatcaac cattaagaac ttagggcaaa ttagttgtc tttttttttt 9180
 tttccttgct cctaaagtgg taattcaattt tggatctttaaaaaaaa aaaaaaaaaatcc 9240
 aggcaagaa agcgtgggtg gctgaggaga tgccggcctc ctaaaaactg gctgcataa 9300
 tgcagggctt gaagggggac cttgtggaa tggacagag taagaaggctt agaaggcagt 9360
 ataggaatca aagacagacc tcctcaactt acgtgaaaga gcccacccctc cgggtgaacc 9420
 atgctagccc agtgtccccca gagagcaaca tccagaggc acagaacccc taacgtcacc 9480
 tgaggaccag agtgagggtg cgtggcaggg attttaaggg cttccacag cgggtgaagt 9540
 aataatagata cgttccagcc ccaactcaag cgaggccggg acaaggcaga caggaggcca 9600
 ctgatagatc aaagtcaact tcatgcctt ccaatcagaa caagaactttt ctcccacagc 9660
 tgaggctaaa tctccacagg agtgaacaa gtgtggggaa caggcagaga ctcttcgacg 9720
 tcggactctg ggtctctcac tgcttagtctt ggaaggactt actgaggaaa cctgaagaca 9780
 tgacaatggt cacaaggctg ccactgtcc cagaccgtc tggaccaactt cccgaagaga 9840
 aggacccat agcccaagaa actccttgcc agggccagctt gtaaaatggg tatctctaga 9900
 gtcttagataa atgccttac tccctaagggtt gtttctgc ggcacgtctt gaaggcagaa 9960
 aaaaaaaaaacgg acccttcacg ttccaaaggctt agaactgtgg aaagtgttctt gcaacgttgc 10020
 ccgggtcagc tggagtcaca gttcagttca gaaacaggca ggctggacag gtgtgtgctc 10080
 tgaccactca ggcacccccc tgaggcttca agggtttagt tttgtctcat ttttgggg 10140
 ggttacccat aaaatccaaatcccaactt cttccaaaggctt catgtctaat atcaaatctt atagtgtttt 10200
 attaccaggat gacatgttgg caagggacta tagatgaccc ttggatagg aggaataacctt 10260
 tgctcaccatc tagtcctcc atacctgtt cagttacccat cacccttacatc ataccaacag 10320
 atgacatcat gacggtcaac acagtcaactt ggagggacccctt gagctggaga gggacgttag 10380
 tggcgtaac agaggccagg tgagccactt tctcggtttt gcaaggataa gagtagctt 10440
 gcaaaaaacta ttggatataat cagagcttca gttggcgcctt cttgaagagt tcagactcac 10500
 attagcttca tgactgttga ctgaatctt caggacagttt accaggaaac actggcttctt 10560
 aaaagtctaa agactctggt ccttacatgag aaccagcatac cagggccaaa ggtcactttaa 10620
 tgtccatttc agttccccca tgacccaca caaacccactt gaaaccttagt tcctcgagca 10680

acatgtggga agaaggcctt ccggtttaca aagcaggaaag tctatatcca gccccaccccg 10740
 ccctggacaa gattgaagtc tgggtccccg agggatattt cccagaggtg agtgtgagag 10800
 acctgtcaaa tactgttaact cttgcatgtt ctggctacgg gtgggggtgg ggtgggggtgg 10860
 ggggcagtct gaaggatgcg cagccctgct ttggtaaaa gccacatggg taacacagct 10920
 gtctccccc atacagacac acaaggcata ggatttcctc caagaatcac acagacagct 10980
 gcaccctgaa atgggttaagc tggtcagata gtgaatcaat agccagaatg agaacaggaa 11040
 atggaaaaag tttcccaatt cccitccaggt gtttgggtct gaacagccctt ccacttccat 11100
 gacgtcacgg ctgctgacat gggcaaacag gtcccccctt gaagcttcc cgccagaagcc 11160
 acatccctgt gaaagaggag taaaaatac agagtttagag ataagatctc tccgggccac 11220
 gtgcccgaa gaggttaggct gggcggtac accgcagccc aaccacaggt gcagaaaaga 11280
 aggccacgga gggcacattt ggtggggctt gcaggtcttg gtggtaacac ccattcacag 11340
 cagccggctg gggaggcact gccgcctccac tcccaagaag tccccctcc ctgacacta 11400
 ttgccctcaa attagacaag tctatatact tagttcaagg gagaaagtct atgtccagtc 11460
 cagctgtgc tggacaggtt gtgaaagagg cagctgccta cacacacagc taaggctcgt 11520
 tccccaacag ataccccca caagaagccc cattcgctt catttccact ccaggaggaa 11580
 atttaagtgt caagagataa ccctagtgta catctgtctc tcagggtctt aggaagtcgc 11640
 agaacctgaa acctgaaaaa ctttcgtctt gggagtcctt ctctgttta gtgtcttaag 11700
 gtagccacac gggggcagca gtactccacc aaaaggctt ctccctcggc gtgtttattt 11760
 gggataaaga aaatccctgc atctacgga aaaactctt ccaaaggaaa ataaaatgac 11820
 aagtggcttc tgtttacag ggtctgtccc tggatggttt gaaggacagt gggcatttct 11880
 gatccctctct gcctgcaaag agtcttagggt caggccttca ggcagcaggg gcactgccta 11940
 cccaggttta ggagacctag ctacaagaga aacccagaaa gaaactaccc tggatggaa 12000
 caggagatgg aatatggccc gcaggcccag gatcc 12035

<210> 9

<211> 364

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 9

ggacagggcg tggagcagcc tgacaacttg atgtctgttag agggAACCTT tgctcggtc 60
 aactgcacat acagcacctc agggttcaat gggttatcct ggtaccagca acgtgaagcc 120
 acgccccctt atttcttct tatgttggttt tggatggttt gaaggacagt gggcatttct 180
 ccacatttctt gggccgtcg aatgggtaca gttacctgtt tctgacagag ctccagatca 240
 aagactctgc ctatcaccc tggatggttt gggatagcaa ctatcgttg atctggggct 300
 ctgggaccaa gctaattata aagccagaca tccagaaccc agaacctgtt gtgttaccaga 360
 atcg 364

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic

<400> 10

catagagaac atggcttagga gt

22

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic

<400> 11

43

```

acatcaattt ggcaggctgc
<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
<400> 12
ccatgaacat gcattcgtgc acct
<210> 13
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
<400> 13
cttggccca gagcccc
<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
<400> 14
catccagaac ccagaacctg c
<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
<400> 15
tggcggtt ctctttgaag

```

44

20

24

17

21

20

【図面の簡単な説明】

【図1】V α 19NKT細胞由来融合細胞細胞株のV α 19.1-J α 26遺伝子再構成部位の塩基配列を示す図である。V α 19.1遺伝子の3'端及びJ α 26遺伝子の5'端の配列を対照として示す。生殖細胞遺伝子と同様の配列は一で示す。

【図2】V α 19NKT細胞由来融合細胞細胞株のTCRへの刺激に伴うサイトカイン分泌量を示す図である。NBシリーズはV α 19NKT細胞融合細胞株、RTシリーズはV α 14NKT細胞融合細胞株を示す。

【図3】V α 19.1-J α 26を含むT細胞レセプター-鎖をコードする導入DNAの構造を示す図である。

【図4】V α 19トランスジェニックマウスのゲノムDNAのサザンプロット解析結果を示す電気泳動写真である。

【図5】V α 19トランスジェニックマウスおよび野生

型マウスにおけるRT-PCRの結果を示す電気泳動写真である。

【図6】V α 19トランスジェニックマウスおよび野生型マウスの各臓器におけるNKT細胞の数を示すFACSの図である。

【図7】V α 19トランスジェニックマウス、野生型マウス、およびCD1dノックアウトマウスのNKT細胞の表現型を示すFACSの図である。

【図8】V α 19トランスジェニックマウスおよび野生型マウスのNKT細胞のサイトカイン産生量を示すグラフである。

【図9】V α 19トランスジェニックマウスおよび野生型マウスのIgE産生量、および該マウスに抗IgD抗体刺激を与えた後のIgE量の変化を示すグラフである。

40

【図1】

Germ-line V α 19.1GCT GTG AGG
G GAT AGC AAC Germ-line J α 26

	Ala	Val	Arg	Asp	Ser	Asn
	GCT	GTG	AGG	GAT	AGC	AAC
NB103						
NB115						
NB116						
NB201						
NB202						
NB204						
NB206						
NB212						
NB213						
NB215						
NB403						

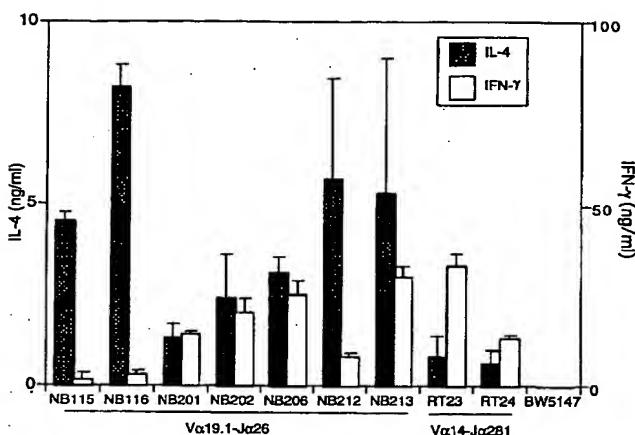
Leu
NB115 --- C CT ---

Arg
NB116 --- --- --- Arg C ---

Gly
NB202 --- --- G-A ---

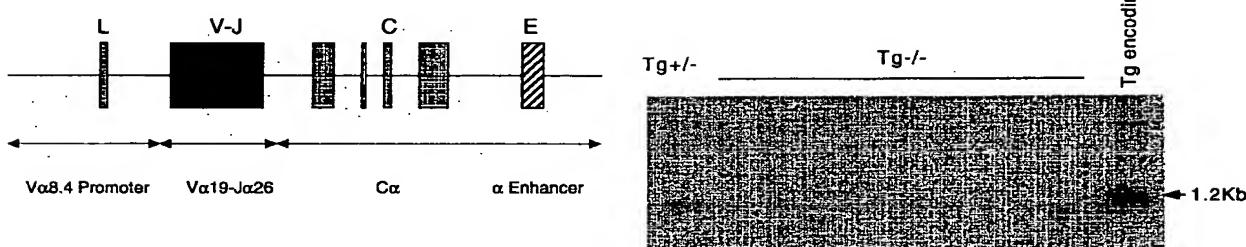
Ile
NB215 --- --- -TC ---

【図2】

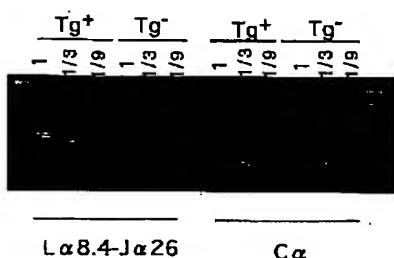


【図3】

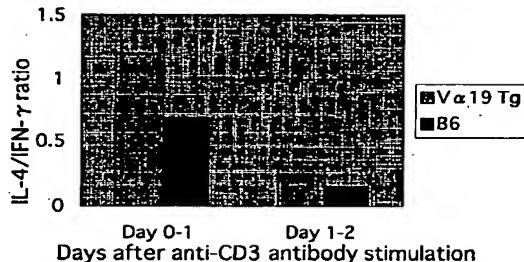
V α 19.1-J α 26 invariant TCR transgene construct



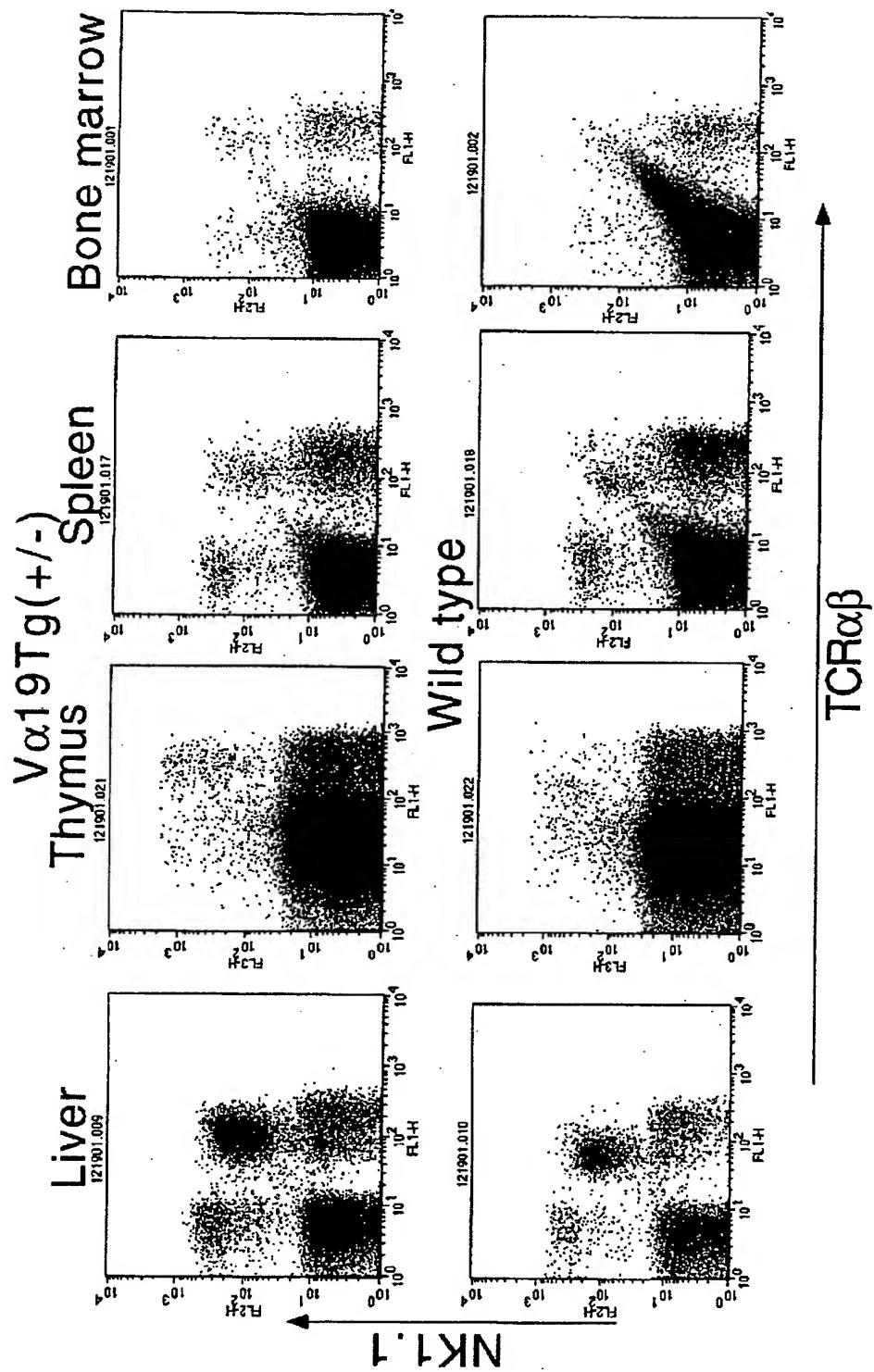
【図5】



【図8】

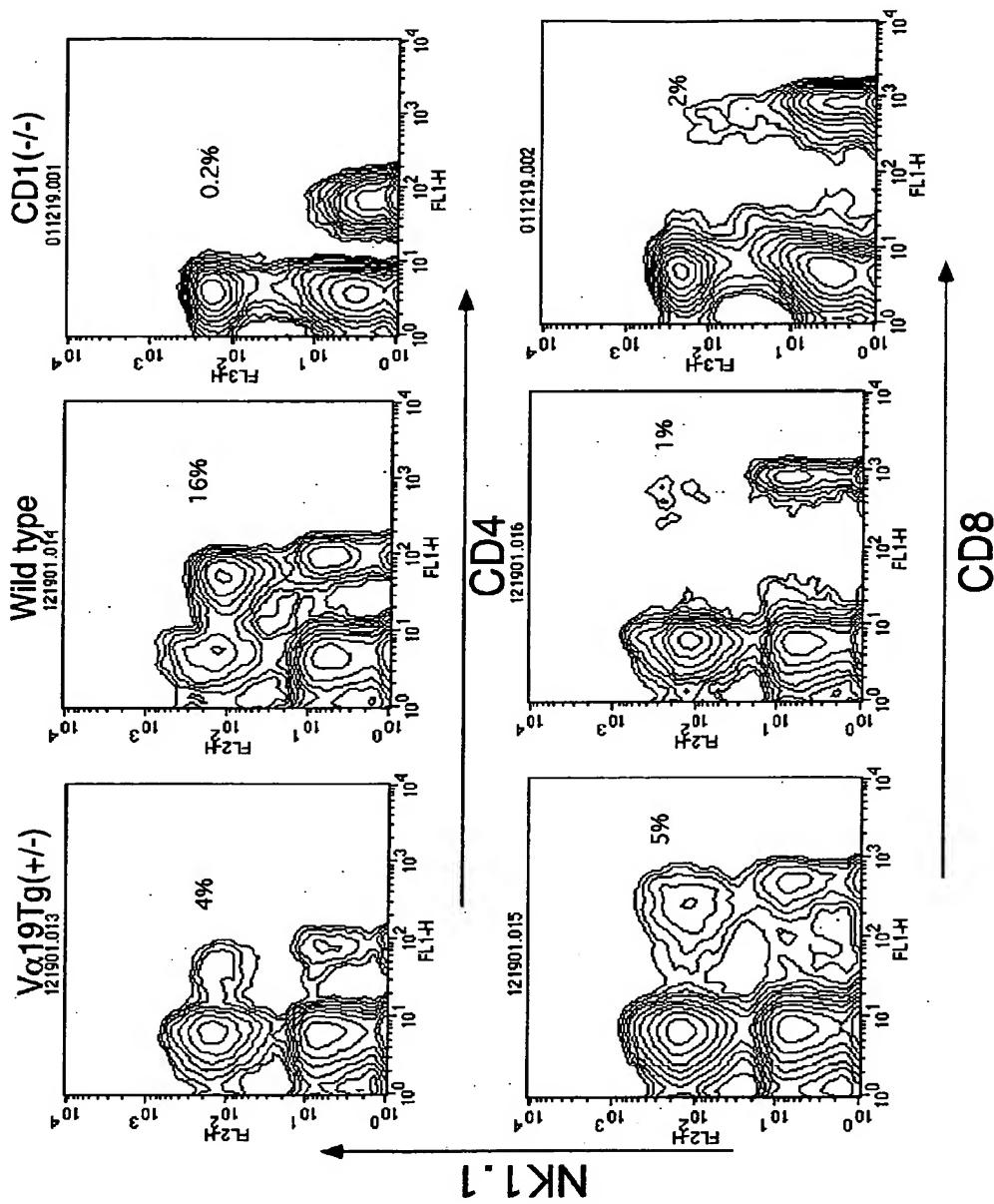


【図6】

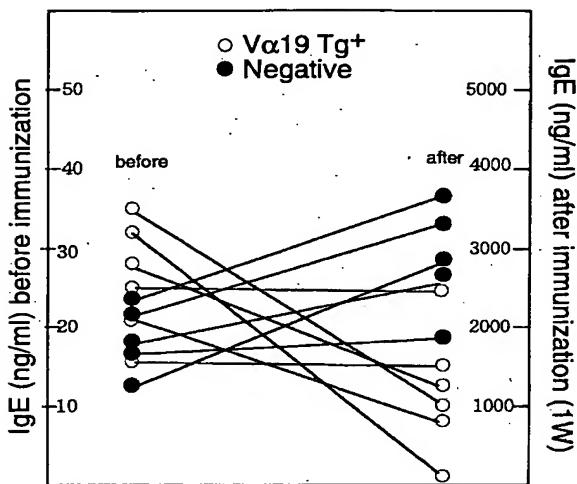


FACS analysis of liver leukocytes

【図7】



【図9】



フロントページの続き

(51) Int.C1. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
C 0 7 K	16/28	C 1 2 Q	4 H 0 4 5
C 1 2 N	5/10	G 0 1 N	Z
C 1 2 Q	1/02		Z
G 0 1 N	33/15		Y
	33/50	C 1 2 N	Z N A A
	33/53		B

Fターム(参考) 2G045 AA29 AA40 CA18 CA25 CB17
DA37 FB03
4B024 AA01 AA11 BA21 BA63 CA04
DA02 EA04 GA03 GA11 HA01
4B063 QA05 QA18 QQ08 QQ70 QQ79
QQ91 QR69 QR77 QS24
4B065 AA92X AA92Y AB01 AB05
AC14 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA17 ZB022 ZB072 ZB132
4H045 AA11 BA10 CA40 DA75 EA22
EA50 FA72

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.